



# Etude des étapes précoces de la mécanoperception chez le peuplier

Delphine Gourcilleau

## ► To cite this version:

Delphine Gourcilleau. Etude des étapes précoces de la mécanoperception chez le peuplier. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22108 . tel-00653354

**HAL Id: tel-00653354**

**<https://theses.hal.science/tel-00653354>**

Submitted on 19 Dec 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°D.U. 2108

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, de la Santé, Agronomie, Environnement

N° d'ordre 542

## Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal  
pour l'obtention du grade de

**Docteur d'Université**

*Spécialité : physiologie et génétique moléculaires*

Soutenue le 11-02-2011

**Delphine Gourcilleau**

# Etude des étapes précoces de la mécanoperception chez le peuplier

Président : Dr Frédéric Delbac, UMR 6023 LMGE, Clermont-Ferrand

Rapporteurs : Dr Jean-Marie Frachisse, UPR2355 ISV, Gif-sur-Yvette

Dr Christian Mazars, UMR 5546 SCSV, Toulouse

Dr Gilles Pilate, UR 0588 AGPF, Orléans

Examineurs : Dr Nathalie Leblanc-Fournier, UMR 547 PIAF, Clermont-Ferrand

Dr Jean-Louis Julien, UMR 547 PIAF, Clermont-Ferrand





## Résumé

Afin de survivre dans un environnement fluctuant, les plantes ont développé la capacité de percevoir et de répondre à des stimuli externes divers et parfois extrêmes. Les sollicitations mécaniques jouent un rôle important au cours du développement des plantes et un nombre croissant d'études s'intéresse à la mécanoperception. Le dessin de la voie de signalisation entre la perception du signal et la régulation des gènes précoces reste incertain. Un modèle de la mécanoperception, proposant que la variable mécanoperçue soit la déformation de la membrane, a été vérifié à l'échelle de la plante entière mais doit être validé au niveau cellulaire. Pour cela, et afin d'identifier les acteurs moléculaires précoces de la réponse à la sollicitation mécanique, nous avons analysé la régulation du gène mécanosensible *PtaZFP2* sur cultures cellulaires de peuplier.

Le gène *PtaZFP2* appartient à la famille multigénique des Q-type C2H2-ZFPs codant des facteurs de transcription putatifs et comprenant 16 membres chez le peuplier. Une analyse phylogénétique et l'analyse de l'expression de ces gènes en réponse à différents stress abiotiques ont montré l'existence de deux groupes phylogénétiques. Ils se différencient par des doigts de zinc caractéristiques et deux nouveaux motifs protéiques (MALEAL et LVDCHY) spécifiques à chacun des groupes. Cette étude nous a également permis d'identifier un autre gène, *PtaZFP1*, proche phylogénétiquement de *PtaZFP2* et fortement induit par une flexion. Après avoir mis au point un système de sollicitation mécanique sur cultures cellulaires, nous avons démontré l'implication du calcium, des calmodulines, des jasmonates et du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans l'induction précoce du gène *PtaZFP2* par un signal mécanique. Nos travaux suggèrent également l'existence d'une interaction entre la NADPH oxydase (enzyme impliquée dans la production d'EAO) et les calmodulines en amont de *PtaZFP2*. Finalement, des résultats préliminaires suggèrent une localisation nucléaire de cette protéine et une accumulation transitoire au sein des tiges 2h après une flexion. Les outils moléculaires produits au cours de ce travail (anticorps, protéines recombinantes) permettront de comprendre le rôle de *PtaZFP2* dans cette voie de signalisation.

**Mots-clés :** *Populus*, sollicitation mécanique, C2H2-ZFPs, facteur de transcription, voie de signalisation, calcium, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.





## Abstract

The ability of plants to perceive and respond to various and even extreme environmental stimuli is crucial for their survival in a fluctuant environment. Mechanical solicitations play a key role during plant development and an increasing number of studies are dedicated to mechanosensing. The way how plants sense mechanical signals and bring about the changes in gene expression is still unknown. Recently, a model of mechanosensing, suggesting that the physical variable perceived by cells is the plasma membrane strain, has been confirmed at the whole plant scale but remains to be validated at the cellular level. In this aim and to identify the molecular components involved in the early steps of the mechanical signaling pathway, the regulation of the mechanosensitive gene *PtaZFP2* was analyzed in poplar cells cultures.

The mechanosensitive *PtaZFP2* gene belongs to the multigenic Q-type C2H2-ZFPs family encoding putative transcription factors, consisting of 16 members in poplar. A phylogenetic study and the expression analysis of several of these genes in response to abiotic stresses, allowed us to detect two phylogenetic groups. These two groups are distinguished essentially on their different signatures of their two zinc finger domains and on the two additional conserved motifs MALEAL and LVDCHY, specific to each phylogenetic group. Another gene of the Q-type C2H2-ZFP family, *PtaZFP1*, related to *PtaZFP2*, was shown to be regulated by bending. After several adjustments to apply a mechanical solicitation to cells cultures, such treatments revealed the involvement of calcium, calmodulins, jasmonic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the rapid induction of *PtaZFP2* gene expression in response to mechanical stress. Furthermore, our data showed an interaction between an NADPH oxidase enzyme (involved in ROS production) and calmodulins upstream of *PtaZFP2*. Finally, preliminary results suggested a nuclear localization of *PtaZFP2* and a transient accumulation of this protein in the stem 2 hours after bending. The molecular tools that have been produced during this work (antibody, recombinant protein) will be used to study the role of *PtaZFP2* in the mechanical signaling pathway.

**Key words:** *Populus*, mechanical solicitation, C2H2-ZFPs, transcription factor, signaling pathway, calcium, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



# Remerciements

On pourrait penser que cette partie de la thèse est de loin la plus facile...je ne trouve pas. Je pense qu'il est tout aussi difficile de rédiger des résultats scientifiques et les discuter que de rédiger des remerciements. Comment être sûre de n'oublier personne ? Comment être sûre de n'oublier aucun moment de soutien, d'encouragement, de rigolade, d'amitié, d'amour...et il y en a eu !! Ma thèse n'a pas été l'une des périodes les plus faciles de ma vie, mais elle a été TRES riche en émotions et j'ai toujours eu quelqu'un vers qui me tourner, sur qui m'appuyer et rebondir que ce soit dans mon bureau, un bureau voisin, à Clermont ou à l'autre bout de la France.

En premier lieu, je tiens à remercier Jean-Louis Julien pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR PIAF et m'avoir fait confiance dès le premier jour (c'est-à-dire à peu près la veille du concours de l'école doctorale). Merci d'avoir toujours trouvé du temps pour suivre l'avancée de mes travaux, pour nos discussions autour du sport en général (du rugby et du foot plus particulièrement et de l'ASM et Sainté très spécifiquement), et surtout, surtout : merci pour mes superbes étagères qui m'ont permis de bien ranger ma biblio...

S'il n'y avait qu'une seule personne à remercier, ce serait certainement Nathalie Leblanc-Fournier. Nath, merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir accueillie dans ton bureau, d'avoir toujours été si positive, d'être à l'écoute et disponible, de prendre le temps de venir à la paillasse...merci pour tout.

Merci à Mrs Jean-Marie Frachisse, Christian Mazars et Gilles Pilate de me faire l'honneur de juger ce travail de thèse et d'en être les rapporteurs. Merci également à Mr Frédéric Delbac d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier les membres de mes deux comités de thèse : Jean-Louis Couderc, Daniel Locker, Christian Mazars et Bruno Moulia. Merci de m'avoir accordé de votre temps et pour vos précieux conseils qui nous ont permis d'effectuer des choix quant à l'orientation de la thèse. Mes deux comités de thèse ont vraiment été des *re-boosters* !



Je remercie bien évidemment tous les membres du PIAF pour leur accueil et la bonne humeur qui règne au sein de ce labo. Je commencerai par les gens avec qui j'ai eu le plaisir de travailler : Bruno pour sa gentillesse, sa pédagogie et son intérêt ; Eric pour sa disponibilité, son émerveillement de la biologie moléculaire et l'azote liquide ; Norbert (si prisé !!) pour avoir trouvé un peu de temps afin de martyriser des cellules avec moi ; Nicole pour sa patience, sa simplicité et sa gentillesse sans égal ; Jérôme pour toute son aide au niveau manip (surtout au niveau protéique), son cynisme (que j'ai su apprendre à adorer) mais sa gentillesse quand même (sisi je vous jure !!) ; Gisèle (qui n'est pas une Piafounette d'ailleurs) d'avoir trouvé du temps pour m'initier aux joies incontestées de la bio-informatique et sa gentillesse (oui tout le monde il est gentil...) et Christelle (sans qui rien n'aurait été possible) pour sa bienveillance, son humour et ses excuses pour manger du sucré. Je n'oublie pas tous les autres Piafounets : Boris (pour les soirées disco), Aurélie (pour ta discrétion, ton écoute et LE pdf !!), Mélanie (pour nos repas du midi, ta gentillesse et tes conseils toujours très avisés), Catherine (pour ta bonne humeur quasi sans faille, tes relectures et d'être ma co-autrice !), Stéphane (pour tes absences, tes oignons de Paris et pour avoir détruit ma si précieuse ménagère), Patricia (pour tes histoires d'un autre temps, Pompidou et tes demi-demi-demi parts de gâteau), Jean-Stéphane (pour tes minutes-culture), Valérie (pour ton Royalisme incomparable), Philippe (pour ton kouign aman), Sylvaine (pour avoir réussi à me tutoyer), Brigitte (pour les regards qui en disent long...), Agnès (pour le vide que tu as laissé : tu es irremplaçable), tous les stagiaires et/ou doctorants : David, Hosam, Aude, Marine, Jing et une mention toute spéciale pour Johann (même si t'es pas un thésard du Piaf) parce que c'était quand même bien avant quand t'étais là... Mes pensées vont également vers tous les membres du GDEC (Julie B. et Julie B., Delphine, Senda et Monique) et du PIAF-INRA (là ils sont trop nombreux pour que je les cite). Nombreux sont ceux qui me manqueront et que je n'oublierai jamais...

Merci à tous les gens qui sont autour de moi pour me soutenir, me demander régulièrement où j'en suis et surtout me faire partager de purs moments de bonheur. Merci aux Fléaux au grand complet et en particulier aux Drouglazet (Klervi et Devrig → DPF !!). Merci à la Mascarade et en particulier aux Delorme, Maman Béa, Marion, Pierrot, Crevette et Yépille : parce que vous m'avez tout simplement manqué pendant ces 3 ans et vous êtes comme une deuxième famille (une graaaande famille). Merci à la famille Gilliotte au sens



large et en particulier à Jean-Pierre, Patricia, Arnaud et Laure pour leur soutien et leur intérêt pour le stress mécanique des arbres.

Comment faire des remerciements sans parler de ma copine Anaïs...Tu es l'une des plus belles choses que m'ait apporté Clermont. Un ENOOOORME merci pour tous ces moments passés ensemble, notre superficialité, notre méchanceté, le step (sans trop réfléchir quand même stp parce que c'est dur...) et puis tout en fait. Il n'y a pas de mots.

Un merci tout spécial à Sainté pour m'avoir fait rêver (ou pas...) et à la SNCF et Cofiroute qui ne m'ont jamais autant vu (et ne me reverront certainement jamais autant) que pendant ces 3 années de thèses.

Bien évidemment, merci à mon « petit » homme...de m'avoir supportée (dans tous les sens du terme) pendant tout ce temps, d'avoir réussi à construire quelque chose avec moi malgré la distance et les moments difficiles, d'être là pour moi tout simplement.

Finalement, merci à TOUTE ma famille. Merci à mes parents et à mon frère d'avoir su gommer la distance et d'avoir toujours, toujours été là pour m'aider et me soutenir dans les moments (très) difficiles, pour tous les bons moments remplis de simplicité et de sincérité et pour votre fierté...Vous avez été, êtes et serez toujours précieux.





# Abréviations

AA	: Acide Aminé / Amino Acid	ECL	: Enhanced
ABA	: Acide ABscissique		ChemiLuminescence
ACC	: acide 1-AminoCyclopropane 1-Carboxylique	EDTA	: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique	EGTA	: Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism	EPSPS	: 5-EnolPyruvylShikimate-3- Phosphate Synthase
AGP	: ArabinoGalactan Protein	ERF	: Ethylene-Response Factor
ANA	: A-Naphtaleine Acetic acid	GdCl <sub>3</sub>	: Gadolinium Chloride
ARN	: Acide RiboNucléique	GFP	: Green Fluorescent Protein
ATP	: Adénosine TriPhosphate	GPX	: Glutathione PeroXidase
C2H2	: 2 Cystéines/2 Histidines	GUS	: β-GlucUronidaSe
Ca <sup>2+</sup>	: Calcium	HRP	: HorseRadish Peroxydase
CaM	: CalModuline	INRA	: Institut National de la Recherche Agronomique
CBL	: Calcineurine B-Like	Zip	: N6-(-2-isopentenyl)adenine
CDPK	: Calcium-Dependant Protein Kinase	JA	: Jasmonic Acid
CHIP	: CHromatin Immuno Precipitation	JA-ile	: JA-isoleucine
Chx	: Cycloheximide	kDa	: kiloDalton
CML	: CalModuline Like	LaCl <sub>3</sub>	: Lanthanum Chloride
CPMCW	: Cytoskeleton-Plasma Membrane-Cell Wall	LB	: Luria Broth
CSC	: Cellulose Synthase Complex	LOX	: LipOXygénase
Cter	: C-terminal	MAPK	: Mitogene Activated Protein Kinase
DIECA	: DIEthylthioCARbamic acid	Mb	: Mégabases
DPI	: DiPhenylenelodonium chloride	MCA	: Mechanosensitive Channel of <i>Arabidopsis thaliana</i>
EAO	: Espèce Activée de l'Oxygène	MS	: Murashige et Skoog
EAR	: ERF-Associated-amphilic Repressor	MscL	: Mechanosensitive channel of Large conductance



MscS	: mechanosensitive channel of small conductance	rpm	: Rotation Par Minute
MSL	: MscS-Like	RT-PCR	: reverse transcriptase PCR
NADPH	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate	S <sup>3</sup> m	: S <sup>3</sup> model, Sum-of-Strain-Sensing model
NLS	: Nuclear Localization Signal	TBS	: Tris Buffered Saline
Nter	: N-terminal	TCH	: TouCH
OPDA	: 12-Oxo-PhytoDienoAte	UMR	: Unité Mixte de Recherche
pb	: paire de bases	UV	: Ultra-Violet
PBS	: Phosphate Buffered Saline	W5	: N-(6-Aminohexyl)-1-naphthalenesulfonamide
PCR	: Polymerase Chain Reaction	W7	: N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulphonamide
PEG	: PolyEthylène Glycol	WAK	: Wall Associated Kinase
PIAF	: Physique et physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et forestier	XET	: Xyloglucane EndoTransglycosylase
Pta	: <i>Populus tremula x alba</i>	XTH	: XET Hydrolase
QALGGH	: Glutamine-Alanine- Leucine-Glycine-Glycine-Histidine	ZF	: Zinc Finger
qPCR	: quantitative PCR	ZFP	: Zinc Finger Protein
Qr	: Quantité relative		
RGD	: Arginine-Glycine-Aspartate		
ROS	: Reactive Oxygen Species		



# Sommaire

<b>Introduction Générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique.....</b>	<b>4</b>
<b>A. Le peuplier, un modèle d'étude .....</b>	<b>5</b>
<b>B. Les végétaux face aux stress .....</b>	<b>6</b>
<b>C. Le stress mécanique .....</b>	<b>7</b>
1. Sollicitations internes.....	7
2. Sollicitations externes .....	10
<b>D. Les réponses thigmomorphogénétiques .....</b>	<b>10</b>
1. Modification de la croissance longitudinale .....	11
2. Modification de la croissance radiale.....	14
3. Modification du système racinaire.....	15
4. Autres modifications et limites .....	16
<b>E. Perception et transduction du signal mécanique .....</b>	<b>18</b>
1. La perception du signal mécanique .....	18
a. La variable physique mécanoperçue .....	19
b. Le continuum cytosquelette – membrane plasmique – paroi : CPMCW.....	21
c. Les canaux mécanosensibles .....	22
2. Les acteurs moléculaires précoces de la voie de signalisation du signal mécanique.....	25
a. Les messagers secondaires .....	25
b. Les calmodulines.....	27
c. Les protéines kinases .....	28
d. Les hormones.....	29
e. Les facteurs de transcription .....	32
<b>F. Les protéines à deux doigts de zinc de type C2H2 .....</b>	<b>34</b>
1. Généralités, structure et classification.....	34
2. Motifs conservés .....	37
3. Fonctions des C2H2-ZFPs .....	38
a. Implication dans le développement .....	38
b. Implication dans la réponse aux stress .....	39
4. Le gène de peuplier <i>PtaZFP2</i> .....	41



G. Objectifs de la thèse .....	44
<b>Résultats.....</b>	<b>47</b>
<b>Chapitre 1 .....</b>	<b>48</b>
Etude phylogénétique des Q-type C2H2-ZFPs chez les plantes et analyse d'expression de gènes de peuplier en réponse aux stress osmotique, au froid et à la sollicitation mécanique	48
<b>Chapitre 2 .....</b>	<b>67</b>
Régulation de l'expression de <i>PtaZFP2</i> suite à une stimulation mécanique.....	67
A. Introduction .....	68
B. Matériel et Méthodes.....	71
1. Cultures cellulaires .....	71
2. Application d'une sollicitation mécanique.....	71
a. Compression de gels d'agarose .....	71
b. Sollicitation par agitation.....	72
3. Traitements cellulaires.....	73
4. Production des constructions contenant le promoteur délété de <i>PtaZFP2</i> en amont des gènes rapporteurs <i>GFP</i> et <i>GUS</i> .....	73
a. Clonage de régions progressivement délétées du promoteur de <i>PtaZFP2</i> par le système Gateway .....	73
b. Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	74
c. Production des cellules de peuplier transgéniques .....	75
d. Traitements cellulaires des lignées transgéniques .....	76
e. Vérifications par PCR .....	76
5. Extractions d'ARN et synthèse d'ADNc (RT).....	77
a. Extraction d'ARNs à partir des gels d'agarose .....	77
b. Extraction d'ARNs à partir de cultures cellulaires et synthèse d'ADNc .....	77
6. Extractions d'ADN .....	77
7. Analyses d'expression par RT-PCR quantitative en temps réel.....	78
C. Résultats .....	79
1. Application d'une sollicitation mécanique sur des cellules de peuplier .....	79
2. Régulation de l'expression de <i>PtaZFP2</i> au cours de la sollicitation mécanique.....	81
3. Délétions du promoteur de <i>PtaZFP2</i> et effet sur la réponse à la sollicitation mécanique ....	82
D. Discussion .....	85
1. Application d'une sollicitation mécanique quantifiable au niveau cellulaire .....	85
2. Régulation de l'expression de <i>PtaZFP2</i> au cours de la sollicitation mécanique.....	88





3.	Etude des zones importantes du promoteur de <i>PtaZFP2</i> .....	91
<b>E.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>94</b>
<b>Chapitre 3 .....</b>	<b>.....</b>	<b>95</b>
	<b>Etude de la protéine PtaZFP2.....</b>	<b>95</b>
<b>A.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>96</b>
<b>B.</b>	<b>Matériel et Méthodes.....</b>	<b>99</b>
1.	Production de souches d' <i>Agrobacterium</i> exprimant la protéine PtaZFP2 en fusion avec la GFP .....	99
a.	Clonage de la fusion PtaZFP2-GFP par le système Gateway .....	99
b.	Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	100
2.	Tests d'agroinfiltration sur des plants de tabac .....	100
3.	Production d'une protéine étiquetée 6-Histidines dans <i>E.coli</i> .....	101
a.	Transformation des bactéries .....	101
b.	Culture bactérienne et induction de la production de protéines .....	102
c.	Extraction des protéines d' <i>E.coli</i> solubles et insolubles .....	102
d.	Purification de la protéine marquée 6-Histidines en conditions dénaturantes.....	103
e.	Détection des protéines.....	103
4.	Etude de l'accumulation de la protéine PtaZFP2 <i>in vivo</i> .....	104
a.	Matériel végétal et conditions de culture .....	104
b.	Sollicitation mécanique .....	105
c.	Extractions de protéines .....	105
d.	Détection des protéines.....	105
5.	Immunolocalisation.....	106
a.	Sollicitations mécaniques .....	106
b.	Fixation et inclusion du matériel végétal dans la résine.....	107
c.	Coupes histologiques .....	107
d.	Immunolocalisation <i>in situ</i> .....	107
e.	Réaction de coloration.....	108
<b>C.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>109</b>
1.	Localisation sub-cellulaire de la protéine PtaZFP2.....	109
2.	Production d'anticorps anti-PtaZFP2 et de la protéine marquée 6-Histidines dans <i>E.coli</i> ..	110
a.	Production d'anticorps spécifiques de PtaZFP2.....	110
b.	Production de la protéine PtaZFP2 dans <i>E.coli</i> .....	110
3.	Etude de la protéine PtaZFP2 <i>in vivo</i> .....	114



a.	Accumulation de la protéine <i>in vivo</i> suite à une stimulation mécanique : détection par western-blot.....	114
b.	Localisation tissulaire de PtaZFP2 : immunolocalisation .....	116
<b>D.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>118</b>
1.	Localisation sub-cellulaire de la protéine.....	118
2.	Production de la protéine dans <i>E.coli</i> .....	120
3.	Etude de la protéine <i>in vivo</i> .....	121
4.	Localisation tissulaire de la protéine.....	122
<b>E.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>124</b>
	<b><i>Discussion générale et Perspectives .....</i></b>	<b><i>125</i></b>
<b>A.</b>	<b>Que se passe-t-il en amont de <i>PtaZFP2</i> lors d'une sollicitation mécanique: la régulation du gène .....</b>	<b>126</b>
1.	La réponse au stress mécanique au niveau cellulaire .....	126
2.	La régulation du gène <i>PtaZFP2</i> .....	128
a.	Les messagers secondaires et les signaux chimiques impliqués dans la régulation rapide de l'expression du gène <i>PtaZFP2</i> au cours d'une sollicitation mécanique .....	128
b.	Le promoteur de <i>PtaZFP2</i> et les facteurs de transcription potentiellement impliqués dans sa régulation .....	135
<b>B.</b>	<b>Que se passe-t-il en aval du gène : étude de la protéine .....</b>	<b>138</b>
1.	Etude phylogénétique et motifs protéiques .....	138
2.	Etude de la protéine.....	140
	<b><i>Références Bibliographiques .....</i></b>	<b><i>145</i></b>
	<b><i>Annexes .....</i></b>	<b><i>162</i></b>
	<b>Annexe 1 .....</b>	<b>163</b>
	<b>Annexe 2 .....</b>	<b>165</b>
	<b>Annexe 3 .....</b>	<b>166</b>
	<b>Annexe 4 .....</b>	<b>167</b>
	<b>Annexe 5 .....</b>	<b>168</b>
	<b>Annexe 6 .....</b>	<b>169</b>
	<b>Annexe 6 .....</b>	<b>169</b>
	<b>Annexe 7 .....</b>	<b>170</b>



# *Introduction Générale*



Dans la nature, les végétaux subissent des contraintes d'origines environnementales variées : teneur en eau ou en composants du sol, intensité lumineuse, température, pathogènes, etc... Si elles sont en excès ou en situation de carence, elles peuvent alors être perçues comme un stress par la plante. Jusqu'à récemment, les sollicitations mécaniques étaient souvent peu considérées. Pourtant, dans les conditions naturelles, les plantes sont constamment soumises aux sollicitations mécaniques qui peuvent être d'origine interne (croissance et différenciation cellulaire, variation de pression de turgescence) ou externe (vent, toucher, passages d'animaux, activités anthropiques ou tout simplement impact de la pluie ou poids de la neige).

Chez les ligneux, cette capacité à percevoir et à répondre aux sollicitations mécaniques est essentielle pour permettre aux arbres de se maintenir droits et d'atteindre des hauteurs pouvant aller jusqu'à plusieurs dizaines de mètres. En effet, pour maintenir leur stabilité dans un environnement mécanique constamment fluctuant (du fait de leur croissance continue et des variations météorologiques), les arbres doivent adapter continuellement la croissance de leur tronc et de leurs branches ainsi que le développement de leur système racinaire pour maintenir leur ancrage au sol (Mouliat *et al.*, 2006). En d'autres termes, un arbre doit mesurer mécaniquement à la fois les conséquences de l'augmentation de son poids propre et de sa prise au vent, afin d'acclimater sa croissance et sa structure. Ces modifications de croissance (réduction de la croissance longitudinale, augmentation de la croissance radiale et de l'enracinement) amènent la plante à être plus résistante aux futures sollicitations mécaniques. D'autre part, la plante doit s'acclimater à son environnement extérieur : si les plantes arrêtaient leur croissance primaire à chaque sollicitation, leur croissance serait extraordinairement faible. La plante doit donc répondre seulement aux sollicitations mécaniques ponctuelles et ajuster sa sensibilité aux flexions successives, ce qui est défini comme l'accommodation (Martin *et al.*, 2010). Si aujourd'hui les réponses physiologiques des plantes aux sollicitations mécaniques sont relativement bien connues, il n'en est pas de même pour les acteurs moléculaires impliqués dans la mécanoperception et sa régulation.

Ce travail de thèse a pour but de mieux caractériser cette voie de signalisation de réponse au stress mécanique chez le peuplier. Certaines molécules ont déjà été décrites comme acteurs de cette réponse (Telewski, 2006; Chehab *et al.*, 2009) et certains gènes





mécanosensibles ont été identifiés grâce à une approche globale (Lee *et al.*, 2005; Leblanc-Fournier *et al.*, 2008), mais les interactions entre ces différents acteurs restent à définir.

Cette étude a débuté au moment où, au laboratoire, un gène mécanosensible induit dès 5 minutes après la flexion a été identifié chez les ligneux (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2009). Ce gène, nommé *PtaZFP2*, code une protéine à deux doigts de zinc de type C2H2, protéines étant décrites dans la littérature comme étant des facteurs de transcription. Chez le peuplier, les travaux de l'équipe ont montré que ce gène s'exprime localement dans la zone fléchie et que l'intensité de son expression est linéairement corrélée à l'intensité de la sollicitation mécanique (Martin *et al.*, 2009). De plus l'induction de l'expression de ce gène en fonction de l'intensité de sollicitation est modifiée suite à des sollicitations mécaniques répétées. Ceci met en évidence un phénomène d'accommodation de la sensibilité mécanoperceptive au cours de l'acclimatation des plantes (Martin *et al.*, 2010). *PtaZFP2* constitue donc un bon marqueur cellulaire précoce, à la fois de la mécanoperception et de la régulation de celle-ci. C'est ce gène que nous utiliserons ici afin de caractériser la voie de signalisation du stress mécanique.

Avant de présenter les résultats obtenus au cours de ces trois années de thèse, une synthèse bibliographique dressera un état des lieux des connaissances actuelles relatives à notre sujet d'étude : mécanoperception, réponses thigmomorphogénétiques, molécules impliquées... Après avoir introduit et décrit la nature et l'impact des stress mécaniques sur le développement des plantes, la synthèse bibliographique présentera les acteurs potentiels de la perception des sollicitations mécaniques et les molécules impliquées dans la voie de réponse précoce. Enfin, puisque le gène d'intérêt est une protéine à doigts de zinc de la famille des C2H2, une partie de la synthèse bibliographique décrira la structure, la fonction, la classification et le rôle de ces protéines dans le développement ainsi que la réponse des plantes aux stress. Finalement, nous décrirons précisément les objectifs de cette thèse.



# *Synthèse bibliographique*



## A. Le peuplier, un modèle d'étude

Le peuplier est un ligneux de la famille des *Salicaceae* et du genre *Populus*. Il comprend de nombreuses espèces et hybrides naturels ou créés par l'homme. C'est un arbre à croissance rapide qui fait partie des arbres les plus productifs des régions tempérées (Zsuffa *et al.*, 1996). Cependant sa forte productivité est liée à une forte exigence en eau (Tschaplinski *et al.*, 1994). Pour cette raison, il est retrouvé à l'état naturel sur les rives des cours d'eau et sa culture est restreinte aux plaines alluviales. La France est le 3<sup>ème</sup> producteur mondial de bois de peuplier avec 240 000 hectares, soit 2% de sa surface forestière : la production, l'exploitation, la transformation du bois de peuplier ont une grande importance économique en France. Le bois de peuplier est principalement utilisé en déroulage pour les emballages légers (cagettes, caissettes, bourriches, boîtes à fromage), les allumettes, le contreplaqué, mais également pour la fabrication de palettes ou pour ses fibres utilisées dans la fabrication de pâte à papier.

L'UMR PIAF (Physique et physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et forestier) s'intéresse à l'impact des facteurs environnementaux sur la croissance et la survie des arbres. Le peuplier est un modèle intéressant pour les approches moléculaires du fait de ses caractéristiques génétiques et des outils disponibles. Il possède en effet un « petit » génome : 485 Mb réparties sur  $2n=38$  chromosomes. Comparativement, le génome d'*Arabidopsis thaliana* comporte 125 Mb sur  $2n=10$  chromosomes et le génome du pin est 40 à 50 fois plus important. *Populus trichocarpa* a ainsi été le premier arbre dont le génome a été entièrement séquencé (Tuskan *et al.*, 2006). Un des avantages de cette espèce est que l'on peut facilement la multiplier par culture *in vitro*. La transgénèse du peuplier est maîtrisée et c'est l'essence qui a fait l'objet du plus grand nombre d'essais et de tests d'arbres génétiquement modifiés. On nommera le clone INRA 717-1B4 sur lequel de nombreux essais de transgénèse sont réalisés en France.

Aujourd'hui le peuplier est devenu une plante modèle pour le ligneux au même titre qu'*Arabidopsis thaliana* pour les herbacées.



## B. Les végétaux face aux stress

L'animal fait face aux agressions du milieu extérieur par une stratégie globale de type « *fight or flight* », c'est-à-dire littéralement « bats-toi ou fuis » : l'animal peut soit combattre le stress et se défendre, soit fuir les situations stressantes vers un environnement plus favorable (Potters *et al.*, 2007). Les végétaux sont pour la plupart des organismes fixés et ne peuvent fuir le stress. Ainsi, beaucoup de plantes modifient leur croissance et/ou leur physiologie lorsqu'elles sont exposées à un stress. C'est ce que l'on peut définir comme la plasticité développementale qui est la capacité d'un génotype à produire différents phénotypes en fonction de son environnement (Pigliucci, 2001). Ces réponses physiologiques permettent aux plantes soit de se défendre directement contre le stress par des processus d'acclimatation, soit de limiter leur exposition à celui-ci par des modifications de croissance ou des décalages phénologiques.

D'un point de vue général les stress induisent des réponses morphogénétiques qui se décomposent en i) une modification de l'élongation cellulaire, ii) une variation locale de la division cellulaire et iii) une altération de la différenciation cellulaire (Potters *et al.*, 2007). Les premières molécules intervenant suite à la perception de ces différents stress sont diverses mais souvent communes. On retrouve parmi celles-ci le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), les espèces activées de l'oxygène (EAO), les phytohormones (auxine, acide abscissique (ABA), éthylène, jasmonates) (Clapham, 1995; Sanders *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2008; Koo and Howe, 2009). La spécificité de la réponse est donnée par la ou les molécule(s) synthétisée(s), le lieu de synthèse, son intensité et sa durée : on parle de signature spatio-temporelle. Ainsi les EAO et le calcium interviennent dans la réponse à de nombreux stress mais c'est la spécificité de leur signature spatio-temporelle qui dicte la réponse (Clapham, 1995; McAinsh and Hetherington, 1998; Gechev *et al.*, 2006; McAinsh and Pittman, 2009). On retrouve également ce phénomène de signature calcique dans de nombreux processus physiologiques chez l'homme (Berridge *et al.*, 1998). Cependant, si les réponses physiologiques aux différents stress sont généralement bien décrites, les mécanismes de perception et les voies de signalisation restent mal expliqués. De nombreuses études s'intéressent donc aux voies moléculaires associées aux stress.





Les stress peuvent être classés en deux catégories en fonction de leur origine. Les stress biotiques résultent de l'interaction de la plante avec un organisme vivant : insectes, herbivores, champignons, bactéries ou virus (bien que la nature « vivante » de ces derniers soit discutée). Inversement, les stress abiotiques sont dus à des facteurs non vivants c'est-à-dire plus généralement aux facteurs de l'environnement : la lumière et les UV, la température, la disponibilité en eau, mais aussi la composition en nutriments du sol, les métaux, les fluctuations mécaniques de l'environnement, etc. Ces facteurs peuvent influencer de façon considérable la croissance et la productivité des plantes.

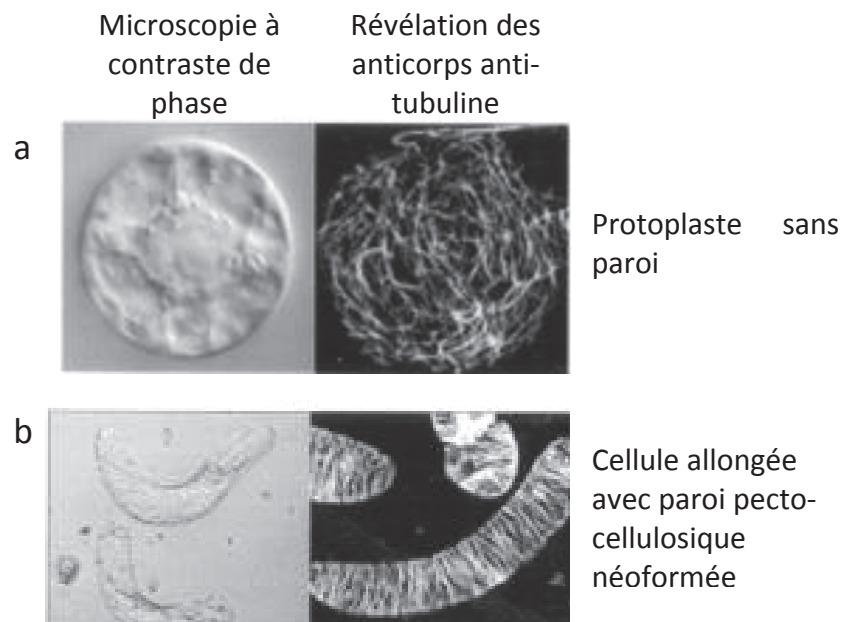
## *C. Le stress mécanique*

Dans leur environnement naturel, les organismes sont soumis en permanence à des sollicitations mécaniques. On trouve des sollicitations mécaniques internes (croissance et différenciation cellulaire, pression de turgescence, poids propre des organes) ou externes (vent, toucher). La capacité de pouvoir percevoir et répondre à ces sollicitations est donc essentielle à la survie des plantes dans un environnement mécanique fluctuant.

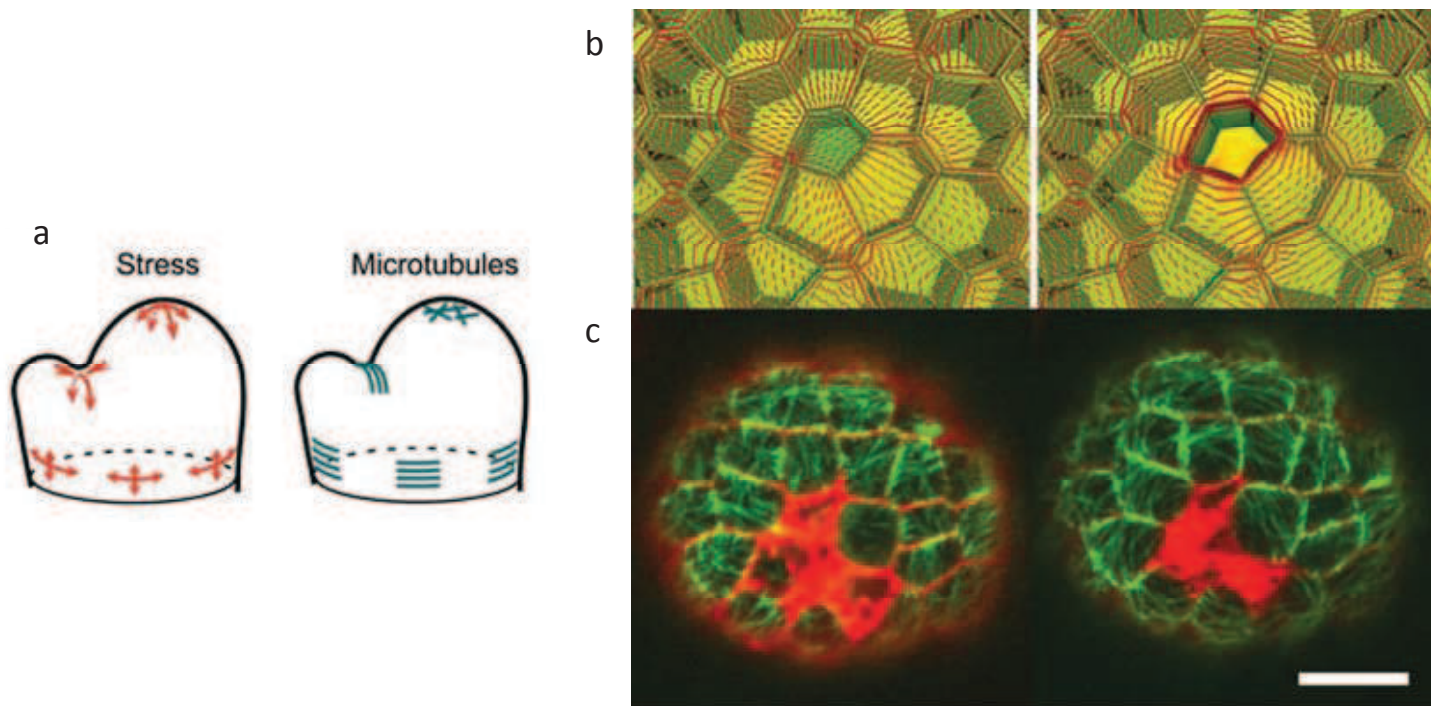
### *1. Sollicitations internes*

Les stimuli mécaniques internes susceptibles d'être perçus par l'organisme sont de différents types.

Au niveau cellulaire, la pression de turgescence exerce une force homogène et multidirectionnelle sur la paroi cellulaire (Schopfer, 2006). Les forces dues à la turgescence générées au sein de la paroi pecto-cellulosique peuvent être différentes autour de la cellule en fonction de la forme et de la structure locale de la paroi. Ainsi une cellule entourée d'une paroi structuralement homogène a tendance à croître de manière isotrope (sous la forme d'une sphère). Les propriétés mécaniques de la paroi sont principalement déterminées par l'arrangement spatial des microfibrilles de cellulose : ces dernières sont à la fois rigides et



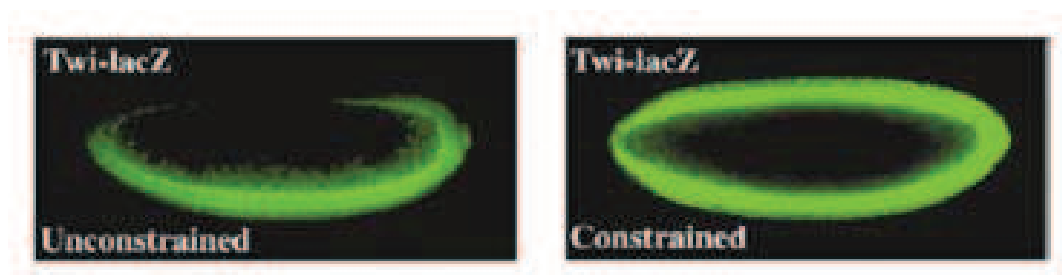
**Figure 1 : Système expérimental pour étudier l'élongation de cellules de tabac.** Après digestion enzymatique de la paroi, des protoplastes sphériques sont produits avec des microtubules corticaux désorganisés (visualisés grâce à des anticorps anti-tubuline) (a). En les replaçant dans un milieu induisant l'élongation, la paroi pecto-cellulosique se reforme spontanément, les cellules réorganisent leurs microtubules et s'allongent dès 7 jours (b) (d'après Fisher et Cyr 2000).



**Figure 2 : Réorientation des microtubules au cours d'un stress mécanique au sein du méristème apical d'*Arabidopsis thaliana*.** Modélisation des zones de stress mécanique et de l'orientation des microtubules dans le méristème : l'orientation des microtubules concorde avec les orientations des contraintes maximales (a). Modélisation de l'orientation des contraintes principales (lignes rouges) au sein des cellules du méristème avant et après ablation de la cellule centrale (gauche et droite respectivement) (b). Orientation des microtubules avant et après cette ablation (gauche et droite respectivement) visualisés grâce à l'utilisation de plantes transgéniques comportant une fusion entre le domaine de liaison d'une protéine s'associant aux microtubules et la GFP (vert) (c, barre d'échelle = 10µm=) (d'après Hamant *et al.*, 2008).

résistantes (l'intensité des contraintes doit être élevée pour les déformer ou les rompre respectivement). L'orientation de ces microfibrilles de cellulose, qui peut varier au cours du temps et au sein de la même cellule, génère une anisotropie des propriétés mécaniques de la paroi, ce qui détermine localement la direction de la croissance cellulaire. Typiquement, dans les couches récemment déposées des parois primaires d'une cellule en élongation, les microfibrilles de cellulose sont orientées perpendiculairement à l'axe longitudinal de la cellule. Cette orientation des microfibrilles va déterminer le sens de la croissance cellulaire : dans ce cas, selon l'axe longitudinal. Les propriétés mécaniques internes de la paroi contribuent donc à l'orientation de la croissance cellulaire. Comment est contrôlé le dépôt localisé et orienté de ces microfibrilles de cellulose ? La cellulose est synthétisée à partir d'un complexe multiprotéique hexamérique, appelé complexe cellulose synthase (CSC). Ce CSC synthétise un faisceau de chaînes de  $\beta$ -1,4-glucane qui s'associent pour former les microfibrilles de cellulose. Or, il a été montré récemment que les microtubules corticaux du cytosquelette contrôlent l'orientation des microfibrilles de cellulose en guidant les mouvements du CSC (Crowell *et al.*, 2009). La Figure 1 (Fisher and Cyr, 2000) présente l'orientation des microtubules corticaux dans un protoplaste dépourvu de paroi, sphérique et sans contrainte (Figure 1a) ainsi que dans une cellule avec sa paroi, en cours d'élongation selon un axe longitudinal : les microtubules sont orientés perpendiculairement à cet axe (Figure 1b).

Au sein d'un tissu organisé, les cellules interagissent mécaniquement avec les cellules avoisinantes. Ces contraintes, liées à un différentiel de croissance entre les cellules, sont appelées autocontraintes (Mouliat *et al.*, 2006), et peuvent être très hétérogènes dans le temps et dans l'espace, et très anisotropes (leur intensité varie selon la direction). Des études récentes suggèrent que la mécanoperception de ces sollicitations internes au sein d'un tissu jouerait un rôle clé pour la synchronisation de la morphogenèse. Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, il a été démontré que l'orientation des microtubules cellulaires était parallèle à l'orientation des autocontraintes maximales rencontrées au sein du méristème (Figure 2a, (Hamant *et al.*, 2008). En modifiant ces signaux mécaniques par ablation de cellules internes au méristème, les auteurs observent une réorientation des microtubules parallèlement à la direction des signaux (Figure 2b). Ces résultats suggèrent que des signaux mécaniques internes régulent la morphogenèse du méristème apical en coordonnant



**Figure 3 : Transcription ectopique du gène ventral *twist* chez l'embryon de drosophile en réponse à une déformation.** La coupe longitudinale de l'embryon montre l'expression ectopique du gène rapporteur *lacZ* sous contrôle du promoteur du gène *Twist* impliqué dans l'embryogenèse en réponse à une déformation (constrained) appliquée au cours de la cellularisation du blastoderme ou en absence de déformation (unconstrained) (d'après Farge, 2003).

l'orientation des microtubules du cytosquelette. Chez les animaux, des signaux mécaniques internes liés aux autocontraintes ont aussi un impact au cours de l'embryogenèse. Chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), certains gènes clés du développement embryonnaire sont mécanosensibles (Figure 3) et une sollicitation mécanique externe entraîne une expression ectopique du gène *Twist* (entre autres) - indispensable pour le développement embryonnaire précoce - ce qui amène à une ventralisation complète de l'embryon (Farge, 2003). L'expression de *Twist* peut également être déclenchée en conditions physiologiques (*in vivo*) par les compressions générées par l'expansion des tissus de la bande germinale (Supatto *et al.*, 2005).

Enfin, à l'échelle de l'organisme entier, les plantes sont soumises à la gravité terrestre. Ainsi, l'augmentation du poids propre de la plante au cours de sa croissance, engendre des contraintes au sein des tissus par l'effet de la gravité sur la masse des composants. Cette perception du poids propre participe à l'allométrie générale (Telewski, 2006). Une étude a démontré que l'application d'un poids (bouchon d'un micro-tube de 2,5 g emballé dans du papier aluminium) placé au sommet d'une tige inflorescentielle d'*Arabidopsis thaliana* de 5 cm pendant 3 jours augmente l'activité cambiale et induit la production de xylème secondaire (Ko *et al.*, 2004). Ces résultats indiquent que les stimuli mécaniques internes engendrés par l'augmentation du poids propre sont continuellement perçus par la tige (Telewski, 2006). Cette notion s'applique également au poids des fruits et à la forme des branches (Alméras *et al.*, 2004). Toutefois cet impact du poids propre sur l'allométrie générale de la plante est négligeable face à l'impact du vent : il a été montré que ce dernier explique mieux l'allométrie générale que le poids propre lui-même (Moulia and Fournier-Djimbi, 1997; Moulia *et al.*, 2006).

Les plantes perçoivent également des variations d'inclinaison de l'axe de leurs organes par rapport à la verticale, ceci *via* la perception de la gravité terrestre. Cette graviperception passe par des signaux mécaniques internes. Elle repose, au niveau cellulaire, sur la sédimentation des amyloplast (ou statolithes) et d'autres organites (comme le noyau). Cette sédimentation induit un signal mécanique interne au niveau de l'interface cytosquelette-membrane plasmique-paroi (Telewski, 2006; Perbal, 2009). Si elle est inclinée, la plante est capable de se redresser en fonction du signal gravitationnel perçu. Au niveau des organes en croissance primaire, la courbure conduisant au redressement résulte d'une



élongation cellulaire différentielle des côtés opposés de l'organe. Au niveau des tiges en croissance secondaire, la réorientation de l'organe est due à la mise en place de bois de réaction (bois de tension sur la face supérieure de la courbure chez les Angiospermes et bois de compression sur la face inférieure chez les Coniférophytes).

L'ensemble de ces expériences souligne l'importance des signaux mécaniques internes au sein d'une cellule mais également au sein d'un tissu au cours du développement et de la morphogenèse des plantes.

## *2. Sollicitations externes*

De nombreux facteurs environnementaux peuvent être perçus comme des sollicitations mécaniques externes par les plantes : l'impact des gouttes de pluie, le poids de la neige, le vent, le passage d'animaux, les contacts avec les insectes ou les plantes voisines, mais également des facteurs anthropiques (arrosage par aspersion, arcure, tuteurage...). Certains signaux sont induits par le toucher alors que d'autres, comme le vent, induisent des déformations (flexions et/ou torsions) des organes exposés. L'effet de ces sollicitations sur la croissance ou la physiologie des plantes est qualifié de thigmomorphogenèse (Jaffe, 1973).

La blessure (ou *wounding*) est également souvent considérée dans la littérature comme une sollicitation mécanique. Cependant elle implique une lésion et la mort de certaines cellules. Ce type de sollicitation lésante ne sera pas décrit dans la suite de ce travail.

## *D. Les réponses thigmomorphogénétiques*

Certains organismes possèdent des « organes sensoriels » dits « tactiles » et sont capables de répondre rapidement à des sollicitations mécaniques externes. C'est le cas des feuilles de la sensitive (*Mimosa pudica*) ou des lobes foliaires préhenseurs des plantes carnivores telles que la Dionée (*Dionaea* sp.). Ces réponses rapides n'impliquent pas de modification de croissance mais sont des nasties dues à des variations de turgescence cellulaire ; elles ne sont donc pas des réponses de thigmomorphogenèse. Les réponses





thigmomorphogénétiques regroupent toujours des modifications de croissance et de développement suite à un stress mécanique. D'une manière générale, on observe une diminution de la croissance longitudinale de la partie aérienne, une augmentation de l'enracinement et, chez certaines espèces, une stimulation de la croissance radiale (Jaffe and Forbes, 1993). D'autres modifications peuvent être observées comme une réduction de la taille des pétioles ou de la surface foliaire, des modifications de la teneur en chlorophylle ou en hormones, de la résistance aux stress biotiques ou abiotiques, du délai de floraison, de la sénescence, de l'ouverture des stomates (Biddington and Dearman, 1985; Chehab *et al.*, 2009). L'ensemble de ces modifications morphologiques conduit à la production de plantes plus trapues, mieux enracinées, offrant moins de prise au vent (Telewski and Jaffe, 1986).

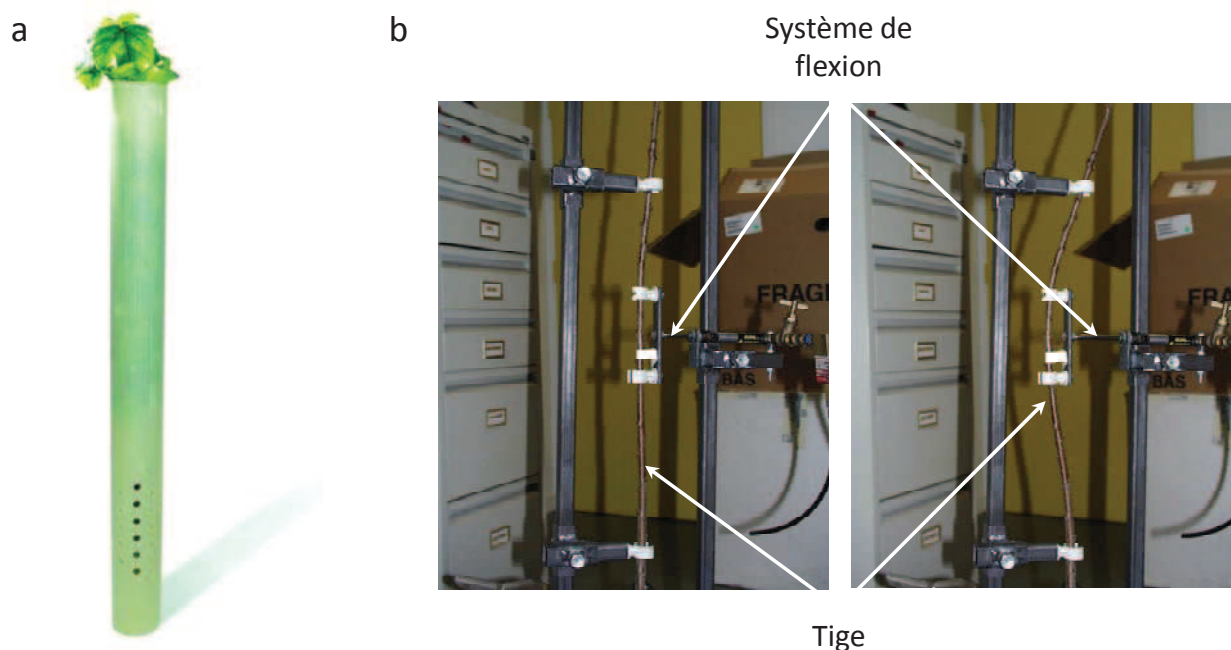
#### 1. *Modification de la croissance longitudinale*

De nombreuses études se sont intéressées à l'effet du vent en tant que sollicitation mécanique naturelle. Ainsi, dès 1954, Jacobs observait une légère augmentation de la croissance en hauteur de pins (*Pinus radiata*) tuteurés par rapport à des plants soumis aux oscillations dues au vent (Jacobs, 1954). De la même façon, toujours chez les Coniférophytes, de jeunes plants de mélèze (*Larix laricina*) laissés libres au vent présentent une réduction de la taille par rapport à des plants tuteurés (Larson, 1965). Des pins (*Pinus contorta*) d'environ 24 m de haut, tuteurés pendant 6 ans, présentent également une augmentation de croissance de 40% comparativement à la période de pré-tuteurage. Par opposition, les plants témoins non tuteurés ont tendance à diminuer leur croissance de 20% pendant cette période (Meng *et al.*, 2006).

Chez les Angiospermes herbacées, des plants de maïs (*Zea mays*) ou de tournesol (*Helianthus annuus*) exposés au vent produisent des tiges plus courtes que des plants abrités (Whitehead, 1962). Plus récemment, en 2004, Moulia et Combes ont placé des plants de luzerne (*Medicago sativa*) en plein champ au centre d'un cadre métallique supportant un grillage qui limite leur course sous l'effet du vent. En fonction de la gamme de vent, les plants de luzerne du reste du champ présentent une réduction de 0 à 65% de leur biomasse



**Figure 4 : Effet du vent sur la croissance de plants de luzerne.** Les plants de luzerne au centre de la photo ont été protégés de l'effet mécanique du vent par un grillage. Ils présentent une augmentation de biomasse aérienne pouvant aller jusqu'à 65% (Moulia et Combes, 2004).



**Figure 5 : Protection des plants de merisiers avec un tubex (a) et système de flexion installé à l'intérieur des tubex (b)** (Coutand *et al.*, 2008).

aérienne par rapport aux plantes protégées des effets mécaniques du vent au centre du cadre métallique (déformation limitée, Figure 4) (Moulià and Combes, 2004).

Chez les Angiospermes ligneuses, en 2008, Coutand et ses collaborateurs se sont intéressés à l'impact des tubex (protection en plastique autour du tronc contre les herbivores) sur la croissance des plantes (Figure 5a). Si ces abris ont une influence sur le microclimat et les échanges gazeux, ils ont également pour effet d'abriter les plantes des sollicitations mécaniques dues au vent. Il a ainsi été montré que la croissance annuelle de tiges de merisier (*Prunus avium*) abrités était 2 à 3 fois plus importante que celle d'arbres non abrités. De plus, des sollicitations mécaniques artificielles appliquées à l'intérieur du tubex (Figure 5b) réduisent significativement l'élongation des tiges et cet impact est visible dès deux semaines (Coutand *et al.*, 2008).

En laboratoire, les réponses physiologiques à des sollicitations mécaniques (toucher, frottement, flexion, vibrations...) ont également été étudiées. Dès 1963, Salisbury montre que des touchers répétés de feuilles de jeunes plants de *Xanthium* sp. causent une inhibition de 30% de la croissance (Salisbury, 1963). Des études portant sur d'autres herbacées ont montré que des flexions quotidiennes conduisent à une diminution de la hauteur de la tige de 7% chez le tournesol et 9% chez le maïs (Goodman and Ennos, 1996). Chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*), des mesures continues à haute résolution de la croissance ont permis de caractériser la cinétique de la réponse. Une flexion contrôlée de la tige entraîne un arrêt de croissance primaire dès 5 minutes, puis la croissance reprend après 65 minutes mais à une vitesse inférieure à celle du témoin. Les tiges fléchies et non fléchies ne retrouvent une vitesse d'allongement similaire qu'au bout de 2 à 16 heures (Coutand and Moulià, 2000). Ceci suggère un transfert d'information entre la zone fléchiée et l'apex en croissance. Déjà en 1997, Depège et ses collaborateurs (1997) avaient montré que le frottement d'un entre-nœud de tomate ayant terminé sa croissance primaire entraîne une diminution de la croissance à distance, c'est-à-dire au niveau des entre-nœuds en croissance et non stimulés : il y a donc une transmission d'un signal secondaire de la zone sollicitée jusqu'à la zone en croissance et la réponse est donc (au moins en partie) systémique. Jaffe et ses collaborateurs (1980) avaient mis en évidence le même phénomène chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) en réponse au frottement ou à la flexion de la tige (inhibition de



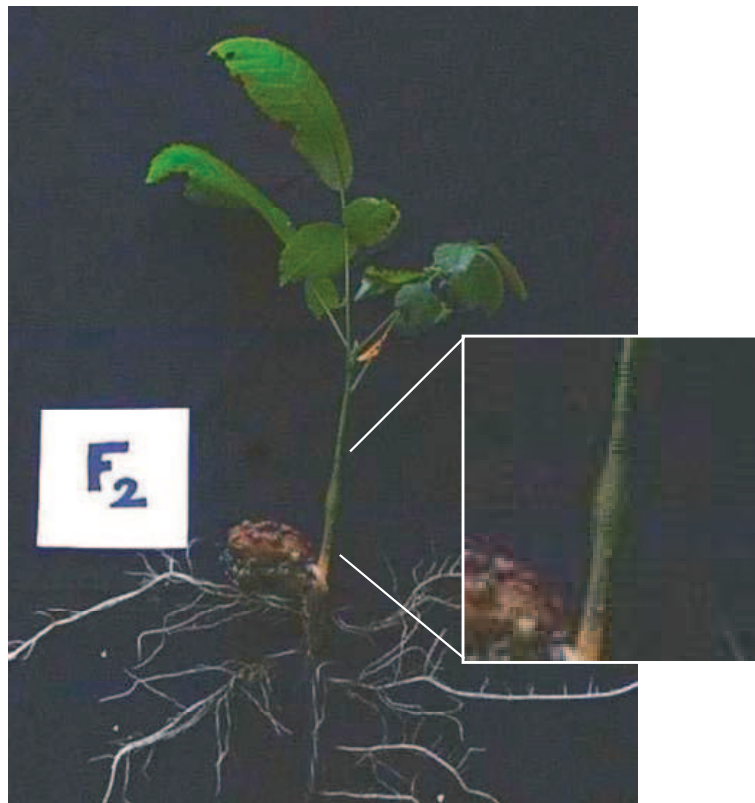
**Figure 6 : Effet du toucher sur des plants *d'Arabidopsis thaliana*.** Les plants d'*Arabidopsis thaliana* à droite ont été touchés deux fois par jour. Ils présentent une inhibition de l'élongation de la hampe florale et un retard de floraison (Braam, 2005).

l'élongation des entre-nœuds non sollicités). A l'heure actuelle, la nature de ce signal transmis dans la plante n'a pas été identifiée et on ne connaît pas les événements conduisant à l'inhibition de la croissance longitudinale. Enfin, ces effets des sollicitations mécaniques peuvent être très marqués. C'est le cas chez *Arabidopsis thaliana* : des plants touchés deux fois par jour présentent une inhibition très forte de l'élongation de la hampe florale (Figure 6) (Braam, 2005).

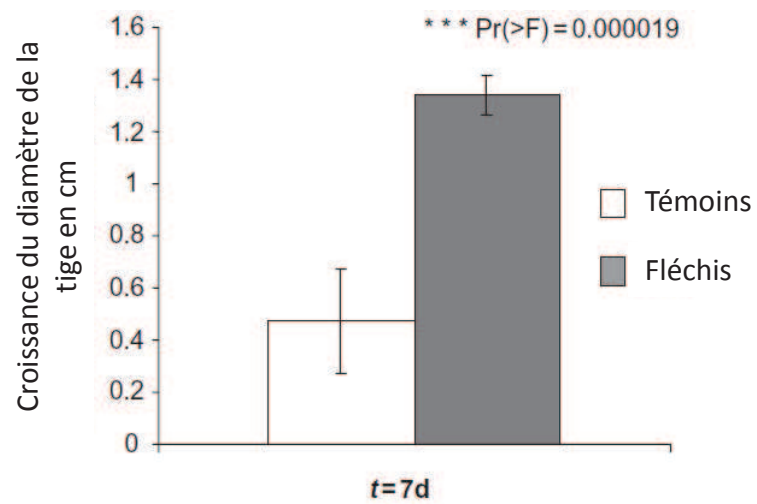
Toujours en laboratoire, des résultats similaires ont été observés chez les ligneux. Ainsi, en 1986, Telewski et Jaffe comparent l'effet de flexions naturelles dues au vent en plein champ et de flexions imposées mécaniquement en laboratoire sur le sapin de Fraser (*Abies fraseri*). Dans les deux cas, une inhibition de l'élongation de la tige est observée (Telewski and Jaffe, 1986). Des flexions quotidiennes de la tige pendant 3 semaines entraînent une diminution de la croissance en hauteur chez l'orme d'Amérique (*Ulmus americana*) et ceci de manière exponentielle avec la flexion imposée (Telewski and Pruyn, 1998), suggérant ainsi l'existence d'une corrélation entre la sollicitation mécanique perçue par la plante et l'intensité de sa réponse. Chez le noyer (*Juglans regia*), l'application de flexions bidirectionnelles quotidiennes de la tige pendant une semaine conduit également à une diminution de la croissance longitudinale (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008). Une étude visant à comparer deux hybrides de peuplier (*Populus trichocarpa x deltoides*) montre toutefois que la réponse peut être différente en fonction du génotype. En effet, l'un des hybrides répond à la sollicitation mécanique en diminuant sa croissance longitudinale (hybride 11-11) alors que le second l'augmente (hybride 47-174) (Pruyn *et al.*, 2000).

D'autres études se sont intéressées à l'effet de stress sismiques ou dynamiques (agitation ou vibrations). Par exemple, des plants de soja (*Glycine max*) agités périodiquement présentent des tiges plus courtes que des plants non agités (Pappas and Mitchell, 1985). De la même façon, la vibration produit une réduction de la hauteur de la tige chez le pêcher (*Prunus persica*) (Onguso *et al.*, 2006). Cependant la plupart des études semblent montrer que l'effet du stress sismique dépend beaucoup de son intensité et/ou des autres variables environnementales et peut conduire à des résultats opposés (Akers and Mitchell, 1984; Mitchell, 1992; Uchida and Yamamoto, 2002).

a



b



**Figure 7 : Effet d'une flexion quotidienne sur la croissance en diamètre chez le noyer.** Après 7 jours de traitement, on observe un bourrelet (a) correspondant à une augmentation significative du diamètre (b) au niveau de la zone fléchie (d'après Leblanc-Fournier *et al.*, 2008).

## 2. Modification de la croissance radiale

La plupart des études menées sur la croissance radiale et sur l'effet de sollicitations mécaniques rapportent une augmentation du diamètre des tiges suite à un stress mécanique.

Ainsi, si on reprend les études citées dans la première partie, Jacobs (1954) note que les pins (*Pinus radiata*) laissés libres au vent montrent une croissance en diamètre accrue par rapport aux plants tuteurés (Jacobs, 1954). De la même façon, des plants tuteurés de pins (*Pinus contorta*) présentent une croissance radiale diminuée (Meng *et al.*, 2006). Il en est de même avec des plants de merisiers placés en tubex (et donc à l'abri du vent) et cette croissance radiale est significativement augmentée lorsque les plants sont fléchis à l'intérieur du tubex ou laissés libre au vent (Coutand *et al.*, 2008).

En laboratoire, Telewski et Jaffe (1986) rapportent également une augmentation de la croissance radiale - et ceci en direction de la contrainte mécanique imposée - chez le sapin (Telewski and Jaffe, 1986). Chez l'orme d'Amérique, les plants témoins ont un diamètre plus petit que les plants soumis au stress mécanique (flexion quotidienne pendant 3 semaines) (Telewski and Pruyn, 1998). Des plants de noyer subissant une flexion bidirectionnelle quotidienne pendant une semaine montrent une expansion radiale trois fois plus importante que les témoins, expansion tellement importante que l'on peut observer un épaississement à la base de la zone fléchie (Figure 7a) (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008). Chez le peuplier, une flexion quotidienne appliquée pendant deux mois, entraîne une augmentation significative du diamètre de la tige chez les deux hybrides de *Populus trichocarpa x deltoides* comparés (Pruyn *et al.*, 2000). En mesurant en continu la croissance en diamètre chez un hybride *Populus tremula x alba*, Coutand et ses collaborateurs (2009) ont montré qu'une flexion unique entraîne un arrêt de croissance de 4h, puis une augmentation de la croissance cambiale pendant 11 jours suivant une flexion de la tige de peuplier, avec une croissance maximale au 3<sup>ème</sup> jour environ. Cette augmentation de diamètre serait due à une augmentation de l'activité cambiale (Martin, 2009).

Cependant, certains résultats viennent nuancer ces tendances générales. Biddington et Dearmen (1985) se sont intéressés à l'effet du brossage (« *brushing* ») sur le chou-fleur





(*Brassica oleracea*), la laitue (*Lactuca sativa*) et le céleri (*Apium graveolens*). Ils ont alors montré que si chez la laitue on observe bien une augmentation du diamètre de l'hypocotyle en réponse au broyage, le chou-fleur présente lui une diminution de diamètre (Biddington and Dearman, 1985). Par contre, en 1996, Goodman et Ennos n'ont observé aucun effet du stress mécanique (flexions quotidiennes) sur le diamètre des tiges de maïs (un organe sans cambium) ou de tournesol.

### 3. *Modification du système racinaire*

Le système racinaire peut lui aussi être impacté par les stress mécaniques. Ces réponses sont variées selon l'espèce et les conditions de l'étude. Ainsi, on observe une réduction de la longueur des racines, de leur nombre et de leur masse sèche chez la laitue, le céleri et le chou-fleur suite au broyage (Biddington and Dearman, 1985), alors qu'un stress mécanique ne semble pas affecter le système racinaire de certaines espèces comme *Cucurbita melopepo*, le tournesol, le pois (*Pisum sativum*) ou la tomate (Biddington, 1986; Gartner, 1994).

Beaucoup d'études rapportent une augmentation du volume racinaire, qui augmenterait l'ancrage de la plante dans le sol. Goodman et Ennos (1996) ont ainsi démontré que des plants de maïs et de tournesol présentent des racines plus rigides et plus grosses suite à une flexion de la tige. Le tournesol montre une augmentation significative de la masse sèche de la racine principale et des racines latérales, mais pas des fines racines, alors que le maïs présente une augmentation importante de la masse sèche des racines latérales et des fines racines, reflet de stratégies d'enracinement différentes (Goodman and Ennos, 1996). Il a été observé que l'initiation de racines latérales, et donc la ramification de la racine principale conduisant à l'augmentation du volume racinaire, peut être induite mécaniquement par une simple flexion de la racine chez *Arabidopsis thaliana* (Ditengou *et al.*, 2008; Monshausen and Gilroy, 2009).

Chez les ligneux, une étude menée sur le mélèze (*Larix decidua*) et l'épicéa de Sitka (*Picea sitchensis*) montre une augmentation du nombre de racines chez des arbres soumis au vent. De plus, la somme des aires des sections des racines latérales est plus élevée du côté



du vent, ce qui pourrait favoriser d'autant plus la résistance à celui-ci (Stokes *et al.*, 1995). En 2008, Coutand et ses collaborateurs (2008) ont montré, sur le merisier, que des plants protégés des effets du vent par des tubex, ont une fraction racinaire significativement réduite par rapport à des plants protégés du vent mais stimulés mécaniquement. Une stimulation mécanique réalisée à l'intérieur d'un tubex augmente significativement l'allocation de biomasse en direction des racines, mais ne permet tout de même pas d'atteindre le rapport racine/tige des arbres laissés libres au vent. En 2009, une étude comparative sur le chêne (*Quercus robur*) et le robinier (*Robinia pseudoacacia*) montre là encore une augmentation du système racinaire en réponse à une stimulation mécanique de la partie aérienne. En effet, les chênes ayant subi une flexion unidirectionnelle investissent plus dans leurs racines de premier ordre et dans les racines profondes de second ordre et les robiniers allouent relativement plus à la biomasse des racines fines et des racines horizontales de surface (Reubens *et al.*, 2009).

#### 4. *Autres modifications et limites*

D'autres modifications impliquant des processus physiologiques importants pour la plante peuvent être observées en réponse à un stress mécanique. On retrouve parmi celles-ci une réduction de la taille des pétioles ou de la surface foliaire, des modifications de la teneur en chlorophylle ou en hormones, de la résistance à d'autres stress biotiques ou abiotiques, du délai de floraison, de la sénescence, de l'ouverture des stomates (Biddington, 1986; Chehab *et al.*, 2009). Des plants d'*Arabidopsis thaliana* stressés mécaniquement présentent par exemple un retard de floraison (Figure 6 ; (Braam, 2005)). Chez certaines espèces, les modifications thigmomorphogénétiques conduisent à une rigidification des tissus, ce qui réduit les contraintes liées au vent. D'autres espèces produisent des tissus plus flexibles : ceci est une stratégie d'évitement des effets mécaniques du vent (Chehab *et al.*, 2009).

De plus, les effets de sollicitations mécaniques étudiés se limitent souvent à une composante. Par exemple l'effet du vent est souvent étudié *via* l'application d'une flexion mimant la déformation mécanique subie par la plante sous l'effet de celui-ci. Cependant



l'effet du vent ne se limite pas à cette seule flexion. Il faut par exemple tenir compte de l'effet du passage de l'air qui modifie le microclimat et peut influencer la fermeture des stomates. Smith et Ennos (2003) ont tenté de dissocier les effets de l'air et de la flexion en soumettant des plants de tournesol à la flexion ou non (tuteurs) et au passage d'un courant d'air ou non (Smith and Ennos, 2003). Ils ont ainsi mis en évidence que la flexion et le flux d'air ont des effets opposés sur plusieurs aspects du développement. Ainsi le passage de l'air augmente la hauteur et la conductivité de la tige et diminue sa rigidité alors que la flexion réduit la hauteur et la conductivité et augmente la rigidité. Il faut ajouter à cela que le vent ne peut pas être simplement associé à une flexion unique et unidirectionnelle mais plutôt à des séries de flexions multidirectionnelles. Une étude a ainsi comparé l'effet de flexions unidirectionnelles et de flexions de directions variables chez le robinier et le chêne (Reubens *et al.*, 2009). Il en ressort que les effets de flexions unidirectionnelles sont plus marqués que ceux de flexions de directions variables.

Chez le peuplier, la réponse de croissance à des sollicitations mécaniques répétées (flexions) est différente de celle à une sollicitation unique. Ainsi, la croissance en diamètre de la tige est inférieure après trois flexions quotidiennes à celle observée après une flexion unique, suggérant une acclimatation des plantes aux sollicitations mécaniques successives (Martin *et al.*, 2010). Cependant dans ces deux études, les fréquences de flexion appliquées (29 flexions pendant 1 h toutes les 24 h ou 1 flexion par 24 h) ne sont pas comparables aux fréquences observées dans la nature au cours d'épisodes venteux qui sont de l'ordre de 1 à 5 Hertz soit 60 à 300 flexions par minute (Rodriguez *et al.*, 2008).

De plus, il faut noter qu'en condition naturelle, la torsion de la tige s'ajoute à la flexion mais, à notre connaissance, aucune étude n'a étudié ce phénomène de torsion.

En conclusion, la réponse au stress mécanique peut varier, voire être opposée en fonction :

- du type de stress appliqué et de son intensité ainsi que de ses modalités de répétition éventuelle (histoire mécanique de la plante),
- de l'espèce : par exemple le chêne et le robinier présentent certaines réponses communes mais différent pour beaucoup d'autres (Reubens *et al.*, 2009),
- du génotype (Pruyn *et al.*, 2000),



- du stade de développement ou de l'âge des tissus : les tissus les plus jeunes ou les stades de développement les plus précoces semblent plus sensibles au stress mécanique (Biddington, 1986; Fluch *et al.*, 2008).

## *E. Perception et transduction du signal mécanique*

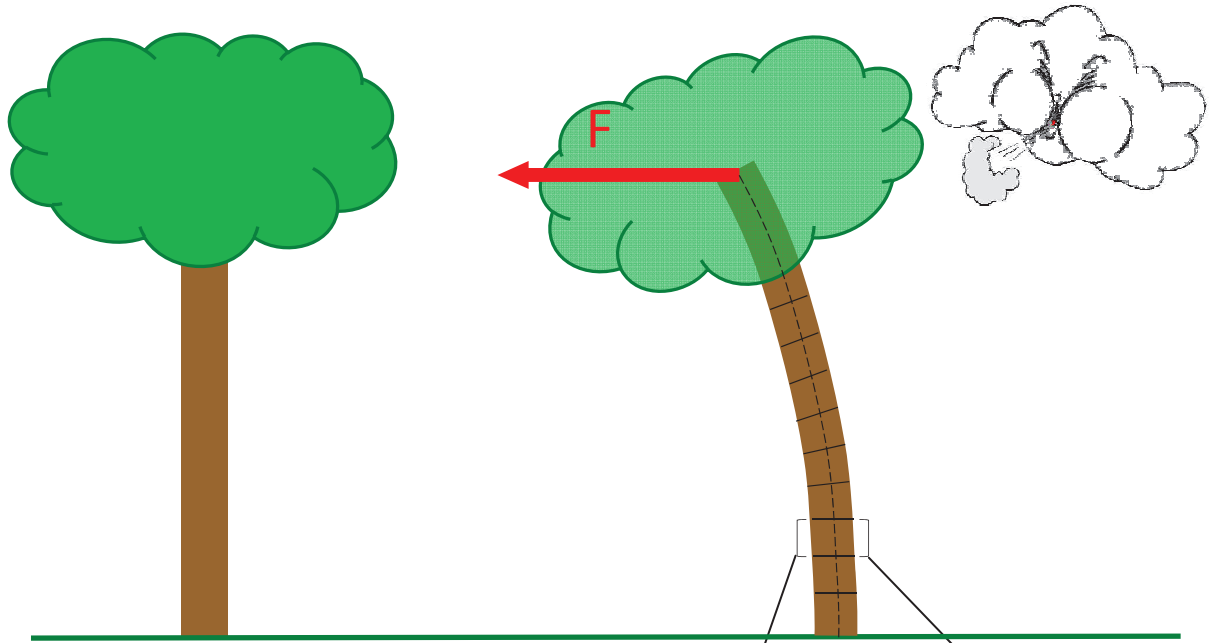
18

### *1. La perception du signal mécanique*

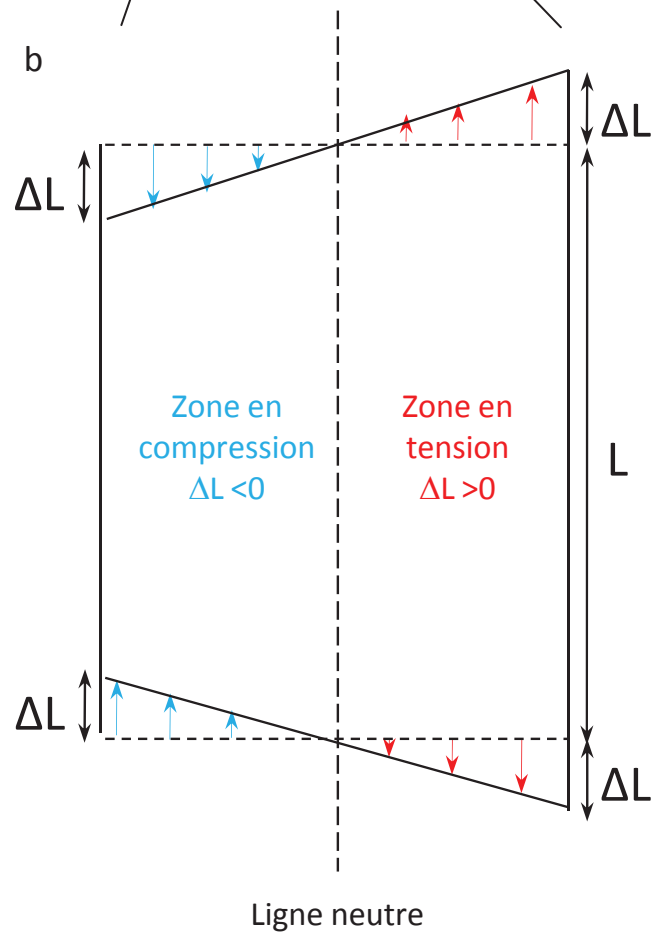
Si la réponse des plantes aux sollicitations mécaniques peut être très variable en fonction de leur nature, dans la plupart des cas l'expérimentateur ne contrôle pas précisément la sollicitation appliquée. En effet flexion/frottement/brossage sont difficilement quantifiables et leur intensité peut donc varier en fonction de l'expérimentateur et de la forme ou de la taille de la plante. Ceci peut amener des réponses variables et des études difficilement comparables ou reproductibles. Déjà en 1980, Jaffe et ses collaborateurs (1980) avaient tenté de mettre au point une méthode leur permettant de contrôler précisément la force de flexion appliquée à des tiges de haricot (*Phaseolus vulgaris*). Ils concluaient ainsi pour la première fois à une relation entre la « quantité » du stimulus appliqué et la réponse de la plante. Il paraît donc important de pouvoir quantifier et contrôler précisément la sollicitation appliquée. Toutefois, leur approche ne permettait pas d'analyser la distribution de la sollicitation au sein de la plante. Or cette distribution (et donc le stimulus effectivement appliqué aux différentes cellules de la plante) dépend non seulement de la force externe appliquée, mais de la taille et de la forme de la plante (diamètre de la tige par exemple) et de son anatomie (répartition des tissus rigides d'une part, des cellules compétentes pour la mécanoperception d'autre part). Pour prendre en compte cela, il faut être capable de définir la variable physique mécanoperçue par la plante.



a



b



**Figure 8 : Décomposition des variables mécaniques modifiées au cours d'une flexion.** L'effet mécanique du vent peut être comparé à une flexion due à une force  $F$  (a). Au niveau d'une tranche d'épaisseur infinitésimale du tronc, le moment de flexion engendre des déformations longitudinales ( $\epsilon_{LL} = \Delta L / L$ ) et des contraintes normales (flèches rouges et bleues) sur la section de la poutre (b).

### a. La variable physique mécanoperçue

Au cours d'une exposition au vent, la tige est sollicitée principalement en flexion. C'est donc la flexion plane qui est utilisée en laboratoire pour mimer l'effet mécanique du vent. A l'échelle de la plante, on peut, en première approximation, assimiler la tige à une poutre encastrée à une extrémité et soumise à une force ponctuelle  $F$  à l'autre (Figure 8a). Si on se place maintenant à une échelle plus fine et que l'on considère que cette poutre est constituée d'un empilement de tranches d'épaisseur infinitésimale, le moment de flexion (le produit de la force par le bras de levier) induit par la force appliquée à chaque tranche entraîne des modifications des variables mécaniques locales. On distingue deux types de variables:

- les déformations longitudinales : le moment de flexion entraîne une rotation de la section par rapport à l'axe de la tige, et ainsi des déformations dans la direction longitudinale de la tige. La déformation, notée  $\varepsilon$  est un nombre adimensionnel qui définit l'allongement relatif  $\Delta L$  d'un élément de longueur  $L$  :  $\varepsilon_{LL} = \Delta L / L$ . La zone située du côté interne de la courbure voit sa longueur diminuer ( $\Delta L < 0$ ) alors que la zone opposée s'allonge ( $\Delta L > 0$ ) (Figure 8b).

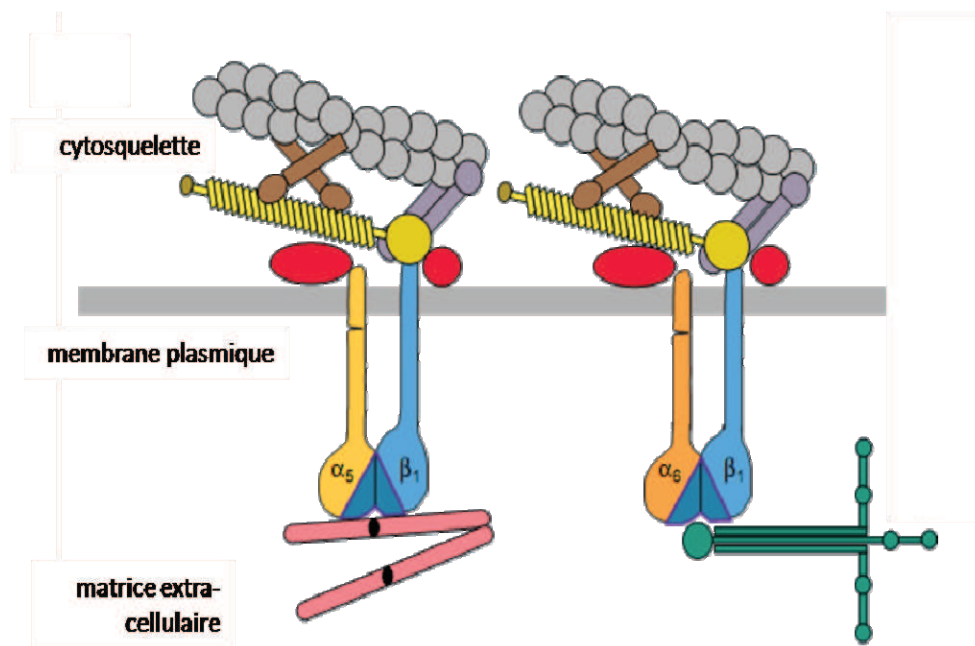
- les contraintes : à ces déformations longitudinales sont associées des forces surfaciques, les contraintes, notées  $\sigma$ . Dans le cadre de la mécanique des petites perturbations, celles-ci sont proportionnelles aux déformations et sont d'autant plus importantes que le matériau est rigide :  $\sigma_{LL} = E_L \varepsilon_{LL}$ . Le coefficient  $E$  est appelé module d'Young (ou module d'élasticité) et rend compte de la rigidité intrinsèque du matériau. Plus un matériau est rigide, plus les contraintes associées pour le déformer sont importantes. Dans la zone où  $\varepsilon$  est négatif, on dit que le matériau est en compression, alors qu'il est en tension lorsque  $\varepsilon$  est positif (Figure 8b).

Coutand et Moulia (2000) ont émis l'hypothèse que chaque cellule percevait sa déformation locale  $\varepsilon_{LL}$  et, plus précisément, que sa perception était proportionnelle à sa déformation et à son volume. Pour les réponses à longue distance de la zone sollicitée (croissance primaire), le signal secondaire transporté vers les zones de croissance semble être proportionnel à la somme des perceptions de toutes les cellules déformées (Moulia et



*al.*, on press). C'est ainsi l'intégrale des déformations longitudinales sur l'ensemble de la zone fléchie - appelée somme des déformations longitudinales ou plus précisément « somme des perceptions des déformations longitudinales » (Moulia *et al.*, on press) - subie par la tige qui explique le mieux la durée de la réponse de croissance primaire chez la tomate (Coutand and Moulia, 2000). Ces résultats ont permis le développement du premier modèle mécanobiologique quantitatif de perception au niveau de la plante, appelé le « Sum-of-Strain-Sensing model » ( $S^3$  model ou modèle  $S^3m$ ). Ce modèle de perception a également été testé sur les réponses thigmomorphogénétiques de la croissance secondaire chez le peuplier. On observe, au sein d'une zone fléchie, une corrélation positive entre la somme des déformations longitudinales sur la section de la tige et la réponse en croissance radiale : plus la somme des déformations est importante, plus l'augmentation de croissance radiale est importante (Coutand *et al.*, 2009). Le modèle  $S^3m$  a ainsi pu être étendu aux deux réponses thigmomorphogénétiques des tiges : croissance longitudinale et croissance radiale (Moulia *et al.*, on press). Enfin l'hypothèse de perception locale du modèle  $S^3m$  (= perception proportionnelle à la déformation subie par chaque cellule) a pu être évaluée par l'analyse quantitative de l'expression du gène mécanosensible *PtaZFP2* utilisé comme marqueur de la mécanoperception (gène de réponse précoce à la flexion, induit 5 minutes après la flexion, et dont la sur-expression est localisée dans les zones déformées, cf. § F Les protéines à deux doigts de zinc de type C2H2, 5 *PtaZFP2*). Dans une étude combinant flexion contrôlée, analyse biomécanique de la distribution des déformations au sein de la tige fléchie, modèle  $S^3m$  et analyse qPCR de l'expression de *PtaZFP2*, il a été montré que l'expression relative (Qr) du gène marqueur variait linéairement avec la déformation moyenne de l'échantillon de tige analysé (sa somme des déformations par unité de volume), conformément au modèle  $S^3m$  (Coutand *et al.*, 2009; Moulia *et al.*, on press). Dit autrement, la cascade de transduction allant jusqu'à la sur-expression de *PtaZFP2* répond quantitativement proportionnellement à la déformation et au volume de la cellule considérée.

Le modèle  $S^3m$  permet ainsi de combiner les effets de la sollicitation externe appliquée et de la structure biomécanique de la tige (la distribution mécanique des déformations est hétérogène dans la tige en fonction de sa taille) à ceux de la structure perceptive (nombre et position des cellules mécanosensibles), et ainsi de quantifier réellement les stimuli



**Figure 9 : Connexions transmembranaires entre la matrice extra-cellulaire (ECM) et le cytosquelette chez les animaux.** Les intégrines ( $\alpha_5/\beta_1$ ,  $\alpha_6/\beta_1$ ) sont composées de récepteurs pour les protéines ECM comme ici la fibronectine (rose) et les laminines (vert). Leur domaine extracellulaire se lie à des sites spécifiques des protéines ECM (souvent des motifs RGD). Leur domaine cytoplasmique se lie à des protéines du cytosquelette sous-membranaire comme ici la taline\* (jaune) ou l' $\alpha$ -actinine (violet) et *via* celles-ci à d'autres protéines comme la vinculine\*\* (marron) ou aux microfilaments d'actine (gris) (d'après Hynes, 1999).

\* Taline : protéine cytoplasmique qui sert d'intermédiaire de liaison entre les intégrines et les filaments d'actine.

\*\* Vinculine : protéine d'attachement des filaments intermédiaires à la ceinture d'adhérence. Comme la taline, elle permet la liaison entre les intégrines et le cytosquelette d'actine.

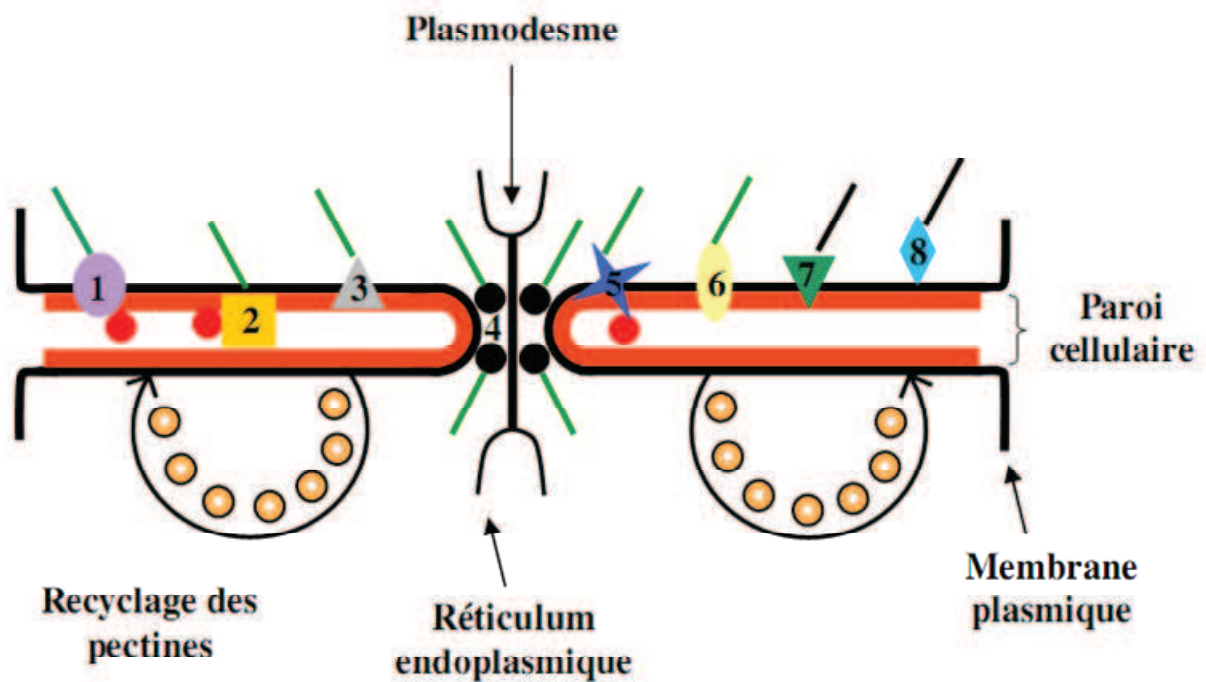
mécaniques appliqués à différentes échelles et niveaux d'organisation : (i) déformation locale au niveau cellulaire *in planta* et (ii) somme des déformations contrôlant la réponse thigmomorphogénétique des zones de croissance (perception systémique) (Moullia *et al.*, on press).

Reste ici toutefois (au moins) une question : comment la cellule est-elle capable de percevoir une variable mécanique comme la déformation et de la transformer en un signal chimique ou électrique interne ? Ces dernières années, un certain nombre d'études s'est intéressé à la compréhension de la perception du signal mécanique par la cellule et de sa transduction.

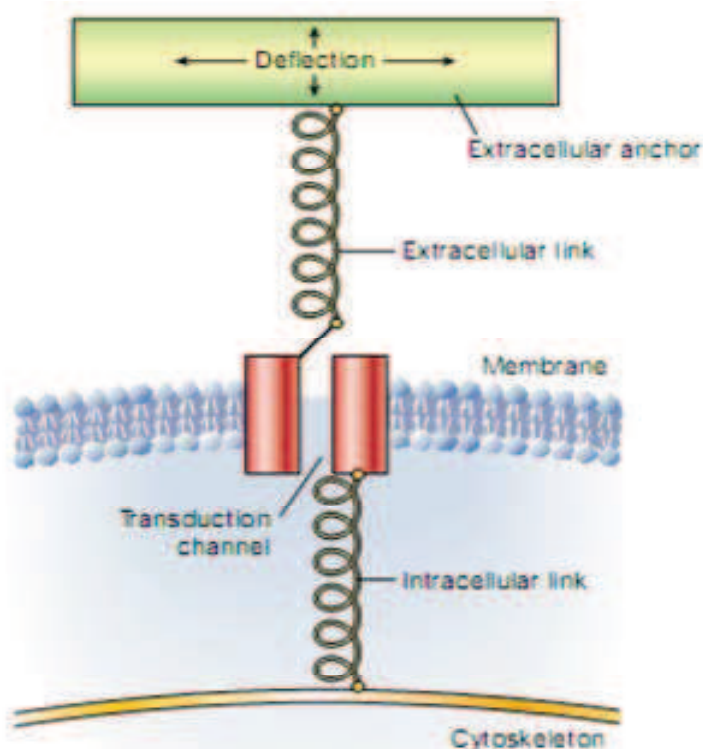
**b. Le continuum cytosquelette – membrane plasmique – paroi : CPMCW**

Chez les animaux, la perception et la transduction du signal mécanique impliquent un couplage physique entre le cytosquelette et la membrane cellulaire grâce à des protéines appelées intégrines. Ces dernières font le lien entre des protéines de la matrice extracellulaire contenant un motif RGD (Arg-Gly-Asp) et l'actine du cytosquelette dans le cytoplasme (Hynes, 1999; Hynes and Zhao, 2000; Baluska *et al.*, 2003) (Figure 9). Ainsi une déformation du milieu extérieur se traduit par une déformation du cytosquelette perçue à l'intérieur de la cellule : les stimuli externes sont transformés en stimuli internes.

Chez les plantes, les études actuelles suggèrent l'existence d'un continuum CPMCW (pour Cytoskeleton-Plasma Membrane-Cell Wall) : des protéines assureraient un lien physique entre la matrice ou la paroi cellulaire, la membrane plasmique et le cytosquelette (Jaffe *et al.*, 2002). Parmi ces protéines, les fibres d'Hechtian assurent la liaison entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique et sont facilement mises en évidence lors de la plasmolyse de la cellule. Cependant la nature exacte de ces protéines fait encore débat. De la même façon que chez les animaux, ces protéines qualifiées d'« *integrin-like* » par Jaffe, reconnaissent un motif RGD chez les protéines extracellulaires. Ainsi, une étude réalisée sur culture cellulaire d'if (*Taxus cuspidata*) montre que des peptides synthétiques contenant la séquence RGD ajoutés au milieu de culture sont capables d'inhiber la réponse à un stress mécanique de type cisaillement (Gao *et al.*, 2007). L'intervention de peptide RGD dans la



**Figure 10 : Représentation schématique des différentes protéines de liaison potentielles entre le cytosquelette, la membrane plasmique et la paroi des cellules végétales.** Ce schéma représente la jonction entre deux cellules de racine avec un plasmodesme traversé par un élément de réticulum endoplasmique. Les protéines de liaison putatives entre le cytosquelette et la paroi comprennent : des WAKs (Wall Associated Kinases, 1), des AGPs (ArabinoGalactan Proteins, 2), des callose-synthases (3), des myosines de classe VIII spécifiques des plantes (4), des kinases récepteurs-like (5), des formines (6), des cellulose-synthases (7) et des phospholipases D (8). Ces éléments de liaison potentiels sont supposés interagir directement, ou *via* d'autres molécules, soit avec des filaments d'actine (traits verts), soit avec des microtubules (traits noirs). Les pectines (ronds rouges) situées dans la paroi peuvent interagir directement avec des WAKs, d'autres kinases récepteurs-like et des AGPs. Des myosines de classe VIII (ronds noirs) s'accumulent dans les plasmodesmes et serviraient d'adaptateurs entre les filaments d'actine et les callose-synthases (d'après Baluska *et al.*, 2003).



**Figure 11 : Fonctionnement général de la transduction du stress mécanique.** Un canal de transduction est relié, *via* des protéines extracellulaires et cytoplasmiques, au cytosquelette et à une structure extracellulaire à laquelle une force est appliquée. Le canal répond alors à la tension appliquée au système, qui augmente par des déplacements nets entre les structures intra- et extra-cellulaires (d'après Gillespie et Walker, 2001).

réponse au stress mécanique a également été montrée chez le chrysanthème (*Dendranthema morifolium*) (Zhou *et al.*, 2006). Toutefois, bien que des anticorps dirigés contre des intégrines semblent reconnaître des protéines chez *Arabidopsis thaliana* et l'algue d'eau douce *Chara* sp. et que les plantes semblent utiliser des protéines contenant le motif RGD pour cette interaction paroi-membrane plasmique, aucune intégrine ou protéine de type intégrine n'a encore été clairement identifiée chez les plantes à ce jour. De plus, ni le génome d'*Arabidopsis thaliana* ni celui du riz (*Oryza sativa*) ne contiennent de réels homologues aux intégrines (Baluska *et al.*, 2003; Monshausen and Gilroy, 2009).

Baluska et ses collaborateurs (2003) remettent donc en cause l'existence de ces protéines « *integrin-like* ». Ils émettent l'hypothèse que l'organisation différente des sites d'adhésion chez les plantes pourrait être expliquée par la nature unique de la paroi cellulaire des plantes. De ce fait, d'autres molécules doivent être impliquées dans l'interaction dynamique entre le cytosquelette et la paroi cellulaire. Les auteurs avancent ainsi un modèle avec les candidats probables pour cette liaison : les WAKs (wall-associated kinases), les AGPs (arabinogalactan proteins), les pectines, les cellulose-synthases, les formines, les myosines de classe VIII spécifiques aux plantes, les phospholipases D et les callose-synthases (Baluska *et al.*, 2003) (Figure 10).

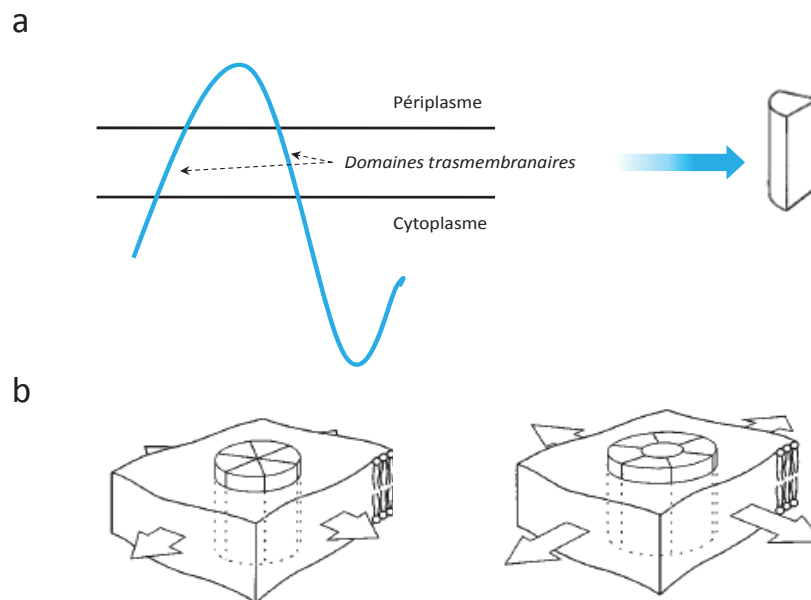
### c. Les canaux mécanosensibles

Des études suggèrent l'existence de canaux ioniques mécanosensibles étant ou non intégrés au continuum CPMCW.

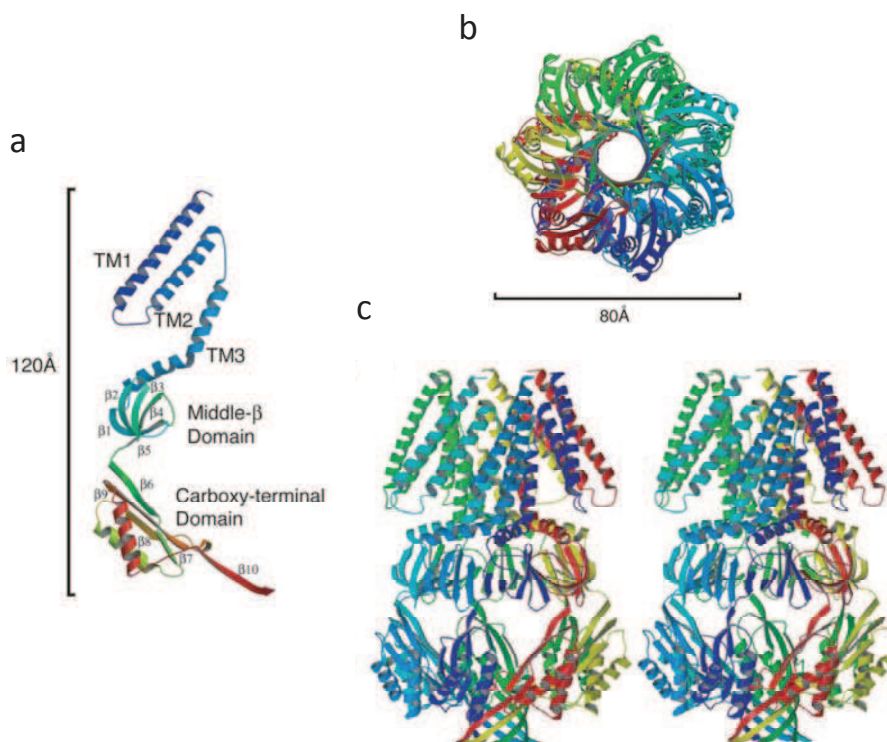
Chez les animaux, la transduction du signal mécanique passe par l'activation de canaux ioniques spécifiques qui peuvent s'ouvrir rapidement suite à la déformation de la membrane plasmique et amplifier le signal en permettant l'entrée d'ions. Ce mécanisme général se caractérise aussi par un phénomène d'accommodation rapide : lors de l'application d'un stimulus soutenu, la tension appliquée au canal décline grâce à un réajustement du système (Gillespie and Walker, 2001).

Les canaux mécanosensibles sont ouverts par une force exercée soit directement *via* la membrane (comme pour le modèle proposé par Jaffe *et al.*, 2002), soit indirectement *via*





**Figure 12 : Modèle d'un canal mécanosensible MscL.** Topologie d'une sous-unité (a) et schéma de la forme homohexamérique et fonctionnement de l'unité fonctionnelle (b). Celle-ci est capable de conduire des solutés ainsi que de détecter et répondre à un étirement mécanique de la membrane lipidique (d'après Sukharev *et al.*, 1997).



**Figure 13 : Modèle d'un canal mécanosensible MscS.** Schéma du repliement d'une sous-unité d'un MscS en vue perpendiculaire avec un gradient de couleur allant du bleu pour la partie N-terminale au rouge pour la C-terminale (a). Les hélices transmembranaires sont nommées TM1, TM2 et TM3, les autres domaines cytoplasmiques sont également indiqués. Vue plongeante de l'heptamère MscS depuis l'extérieur de la cellule et sous sa forme perméable (b) et vue perpendiculaire de l'heptamère MscS, le périplasm étant en haut et le cytoplasme en bas de la figure (c). Pour (b) et (c), chaque sous-unité de l'heptamère est représentée d'une couleur différente. En (a) et (b) les accolades donnent une taille approximative de la molécule (d'après Bass *et al.*, 2000).

des liens avec le cytosquelette et la matrice extracellulaire (Figure 11) (Gillespie and Walker, 2001).

Les canaux mécanosensibles les plus étudiés sont les canaux MscL (Mechanosensitive channel of Large conductance) et les MscS (Mechanosensitive channel of Small conductance) d'*Escherichia coli*. Ils ont été identifiés suite à un stress osmotique amenant à un étirement de la paroi et donc à une déformation mécanique. Les MscL sont des protéines homohexamériques situées au niveau de la membrane plasmique. Le profil hydropathique des sous-unités montre deux domaines membranaires et deux domaines terminaux cytoplasmiques (Figure 12a). Chaque canal est composé de six de ces sous-unités (d'où l'appellation de protéine homohexamérique). C'est la déformation et plus particulièrement l'étirement de la membrane qui permet l'ouverture de ces canaux et donc l'entrée d'ions dans la cellule (Figure 12b) (Sukharev *et al.*, 1997). Ceci permet alors de transformer un signal mécanique en signal électrochimique. Les MscS sont des protéines homoheptamériques où chaque monomère possède trois hélices transmembranaires N-terminales formant le pore. Les domaines C-terminaux interagissent pour former une structure cytoplasmique servant de préfiltre (Bass *et al.*, 2002) (Figure 13). On trouve les membres de la famille des MscL chez les Eubactéries, les Archées et dans un seul génome de champignon. En revanche, les membres de la famille des MscS sont retrouvés dans la plupart des génomes de bactéries ou d'Archées, chez la levure (*Schizosaccharomyces pombe*) et dans le génome de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Chez les plantes, des canaux ioniques mécanosensibles transporteurs d'ions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  ont été mis en évidence en patch-clamp au niveau du plasmalemmes de protoplastes de cellules de garde de *Fabaceae* (Cosgrove and Hedrich, 1991). Une étude du même type a montré l'implication de canaux calciques dans l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule en réponse à une déformation de la membrane (Ding and Pickard, 1993). Cependant, bien que l'existence physiologique de tels canaux ait été démontrée chez les plantes, aucun n'avait encore été clairement isolé jusqu'à récemment (Monshausen *et al.*, 2009).

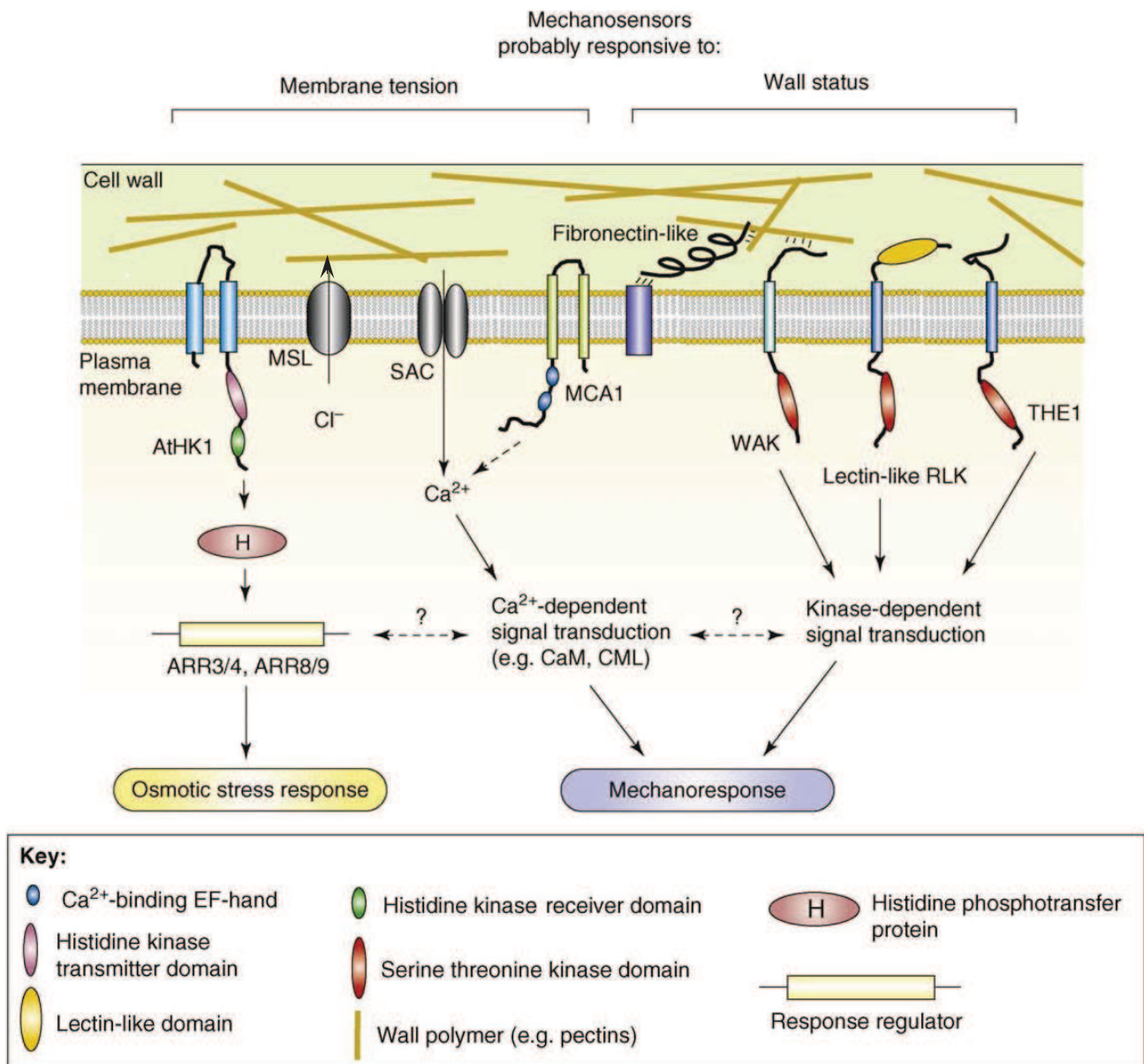
Chez le riz, 6 canaux mécanosensibles homologues aux MscS d'*Escherichia coli* ont été identifiés et 10 chez *Arabidopsis thaliana*: ce sont des MSL (MscS-Like) (Haswell and Meyerowitz, 2006).



Chez *Arabidopsis thaliana*, deux d'entre eux, MSL2 et 3, ont été caractérisés en 2006 et se trouvent sur la membrane chloroplastique. Deux autres MSL, MSL9 et 10, ont été localisés sur la membrane plasmique des racines en 2008 (Haswell and Meyerowitz, 2006; Haswell et al., 2008; Peyronnet et al., 2008). MSL3 est capable de rétablir la résistance au choc osmotique de bactéries mutantes dépourvues d'activité de canaux ioniques mécanosensibles. Des mutations de MSL2 ou MSL3 conduisent à des anomalies dans la taille et la forme des plastes sans amener à des phénotypes visuellement différents au niveau plante entière (Haswell and Meyerowitz, 2006). Bien que MSL9 et MSL10 présentent une activité de type mécanosensible dans les protoplastes dérivés de cellules racinaires, la mutation de leurs gènes n'amène aucun phénotype différent du phénotype sauvage en réponse à des stress osmotique, salin, mécanique ou hydrique, laissant leurs rôles physiologiques inconnus (Haswell et al., 2008). Aucune sélectivité par rapport aux ions n'a été établie pour MSL2 et MSL3 alors que MSL9 et MSL10 semblent être plus spécifiques des ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Ca}^{2+}$ .

Plus récemment, des canaux calciques mécanosensibles d'autres types ont été mis en évidence sur la racine d'*Arabidopsis thaliana* : MCA1 et MCA2 (Nakagawa et al., 2007; Yamanaka et al., 2010). MCA1 est capable de compléter au moins partiellement le mutant *mid1* de levure qui est défectueux pour des canaux calciques mécanosensibles (Nakagawa et al., 2007). De plus le gène *TCH3* d'*Arabidopsis thaliana* (codant une calmoduline – liaison avec le calcium - décrite plus loin), est sur-exprimé chez les plants sur-exprimant MCA1 (Nakagawa et al., 2007; Monshausen and Gilroy, 2009).

Si le mutant *mca2* ne présente pas de phénotype particulier, le mutant *mca1* et le double mutant *mca1-mca2* présentent des retards dans le développement de la rosette et de la hampe florale et leurs racines ne sont pas capables de percevoir un changement de rigidité du milieu d'agar (les racines des mutants *mca1* ou des doubles mutants ne sont pas capables de pénétrer dans de l'agar plus rigide). Ceci suggère que MCA1 est capable de compenser MCA2 mais pas l'inverse et que MCA2 ne serait pas responsable de la perception par la racine au changement de rigidité du milieu. Des plants sur-exprimant MCA1 présentent également un retard de croissance alors que des plants sur-exprimant MCA2 présentent une croissance normale (Nakagawa et al., 2007; Yamanaka et al., 2010).



**Figure 14 : Modèle de mécanoperception proposé par Monshausen et Gilroy (2009).** Les mécanosenseurs appartiennent probablement à deux catégories : ceux activés par la tension de la membrane comme par exemple la famille des MSL perméables aux ions  $\text{Cl}^-$ , et ceux contrôlant le statut de la paroi et/ou faisant le lien entre la paroi et la membrane plasmique. SAC représente un canal calcique mécanosensible identifié par électrophysiologie mais pas encore cloné. AtHK1 opère dans une voie osmo-sensible qui fonctionne probablement à travers une cascade de phosphorylation. Les RLKs (receptor like kinases) comme les WAKs, THE1 et le lectine-like RLK fournissent des modèles du fonctionnement des senseurs de la paroi. Ils élicitent probablement des signaux protéine-kinase dépendants qui peuvent relayer directement l'information mécanique à des gènes mécanosensibles par exemple ou interagir avec une cascade de signalisation  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante qui, aujourd'hui, reste le signal de transduction des événements mécaniques le mieux caractérisé chez les plantes.

Monshausen et Gilroy ont alors proposé un modèle de perception du signal mécanique faisant intervenir des protéines semblables aux fibronectines des animaux (une protéine d'adhésion), des kinases transmembranaires (RLK, receptor like kinases, dont les WAKs) et des canaux mécanosensibles (dont les MSL et MCA1 décrits ci-dessus) (Monshausen and Gilroy, 2009) (Figure 14).

## *2. Les acteurs moléculaires précoces de la voie de signalisation du signal mécanique*

25

Une fois le signal mécanique perçu, une cascade de transduction permet à la plante de modifier l'expression de ses gènes et sa physiologie. Certaines molécules jouant un rôle dans la thigmomorphogénèse ont été identifiées et une certaine chronologie établie mais le dessin précis des voies et le lien entre les différents acteurs restent difficiles à établir (Telewski, 2006). Dans cette partie nous présenterons les différents acteurs de cette cascade de transduction.

### **a. Les messagers secondaires**

#### **✓ Le calcium**

Le calcium est aujourd'hui clairement identifié comme étant un messager secondaire intervenant dans un grand nombre de voies de signalisation, amenant à des réponses physiologiques adaptées en réponse à de nombreux stimuli environnementaux ou développementaux. Dans des conditions « normales », les concentrations cytosoliques en calcium sont maintenues autour de 100 à 200 nM, ce qui est  $10^4$  fois moins que dans l'apoplasme et 10 à  $10^5$  fois moins que dans les organites cellulaires. En effet, les concentrations en calcium sont de l'ordre du  $\mu\text{M}$  dans le REG, le REL ou le noyau et peuvent atteindre l'ordre du mM dans la paroi, les mitochondries, les chloroplastes ou la vacuole. Ceci donne un potentiel pour une entrée importante de calcium dans le cytosol où il agit en tant que messager secondaire (Lecourieux *et al.*, 2006). C'est la signature calcique, c'est-à-



dire les variations spatio-temporelles de la concentration en calcium cytosolique, qui détermine la spécificité de la réponse (White and Broadley, 2003).

Il a été démontré que l'application de gouttelettes de calcium (4 à 10 mM) additionnées d'A23187 (un ionophore du calcium) sur des hypocotyles de pousses de soja entraîne des modifications de croissance similaires à celles de la réponse thigmomorphogénétique (Jones and Mitchell, 1989). L'utilisation de plants de tabac (*Nicotiana tabacum*) transformés par l'aequorine (molécule luminescente en présence de calcium) montre que, dans les conditions de l'expérience (taille et rigidité des plantes), le vent, au dessus d'une valeur seuil, induit une augmentation immédiate de la concentration du calcium cytosolique (Knight *et al.*, 1992). La signature calcique augmente en fonction de l'intensité du stimulus mécanique et est différente de celle induite par le froid. De façon similaire, l'utilisation d'indo-1 (une sonde sensible au calcium) sur des racines d'*Arabidopsis thaliana* montre l'implication du calcium dans la réponse au toucher : on observe une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire dès 1 à 2 minutes après une sollicitation mécanique par le toucher des racines (Legue *et al.*, 1997).

#### ✓ **Les espèces activées de l'oxygène**

Les espèces activées de l'oxygène (EAO, ROS – reactive oxygen species en anglais), provenant du métabolisme de l'oxygène, comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), produisent un stress oxydatif lorsqu'il y a un déséquilibre entre leur production et leur élimination. Bien que le stress oxydatif représente une menace pour toute cellule, il peut, de manière contrôlée, modifier l'activité cellulaire et en particulier participer aux voies de réponses précoces aux stress biotiques ou abiotiques et modifier l'expression des gènes (Desikan *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2008). Il est impliqué dans la réponse à de nombreux stress et de la même façon que pour le calcium, c'est l'aspect spatio-temporel de la production d'EAO qui détermine la spécificité de la réponse de la plante (Gechev *et al.*, 2006).

Ainsi, il a été montré qu'il était possible d'induire un stress oxydatif sur des cultures cellulaires de soja grâce à un stress osmotique ou à une pression physique directe (stress mécanique) et ceci dans les 10 minutes suivant l'application du stress (Yahraus *et al.*, 1995).





La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en réponse à la blessure et l'expression de la GPX (glutathion peroxidase ; enzyme de la voie des EAO) en réponse au frottement ont également été montrées sur des plants de tomate (Orozco-Cardenas and Ryan, 1999; Depège *et al.*, 2000). Cette production ne se limite pas au site de blessure mais touche également des vaisseaux de feuilles éloignées : la réponse est là encore en partie systémique. Des stimulations mécaniques de feuilles de *Mesembryanthemum crystallinum* induisent *in vivo* une augmentation des niveaux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec un pic 15 minutes après la sollicitation (Slesak *et al.*, 2008).

De manière intéressante, Mori et Schroeder (2004) ont montré que les EAO peuvent jouer un rôle dans l'activation des canaux calciques de la membrane plasmique (Mori and Schroeder, 2004). Comme nous l'avons déjà discuté, le calcium pourrait jouer un rôle important dans la réponse au stress mécanique. La relation entre les EAO et le calcium pourrait donc suggérer un rôle important dans cette réponse (Chehab *et al.*, 2009).

#### **b. Les calmodulines**

La perception et la transduction du signal calcique sont assurées par des protéines telles que les calmodulines (abréviation utilisée pour CALcium MODULated proteIN, CaM), les calcineurines B-like (CBLs) et les protéines kinases Ca<sup>2+</sup>-dépendantes (CDPKs) dont la conformation ou l'activité catalytique change lorsqu'elles se lient au calcium (White et Broadley, 2003). Puisqu'une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire est observée en réponse au stress mécanique, on peut s'attendre à l'intervention de protéines de ce type. En effet, trois gènes de CaM ou apparentés aux CaM, appelés gènes *TOUCH* (*TCH1* à *3*), ont été isolés chez *Arabidopsis thaliana* en réponse à différents stress mécaniques (pluie, vent, toucher) (Braam and Davis, 1990; Sistrunk *et al.*, 1994). Ces gènes s'expriment très fortement (on observe une induction de 10 à 100 fois de la quantité de leurs ARNm) et rapidement (dès 10 à 30 minutes après le stress) et sont donc des acteurs précoces de la réponse de la plante au stress mécanique (Braam, 1992). Un autre gène *TOUCH* non apparenté aux CaM, et répondant aussi au toucher, a été isolé en même temps que les trois premiers : *TCH4*. Il code une xyloglucane endotransglycosylase (XET) (Xu *et al.*, 1995). Cette enzyme est capable de modifier la structure de la paroi cellulaire et



interviendrait probablement en aval de la transduction du signal mécanique. Les gènes *TOUCH* répondent à d'autres stress environnementaux comme l'obscurité, les chocs thermiques et en particulier le froid (Braam and Davis, 1990; Braam, 1992; Polisensky and Braam, 1996; Braam *et al.*, 1997). De plus, les gènes *TCH2*, *TCH3* et *TCH4* sont inductibles par le calcium (traitement 100 mM sur des culture cellulaires) et ceci en absence de stimulus mécanique (Braam, 1992). De plus l'induction de ces *TCH* par le choc thermique ou par le froid peut être supprimée par des chélateurs ou des inhibiteurs du calcium (EGTA 100 mM,  $\text{LaCl}_3$  ou  $\text{GdCl}_3$  10  $\mu\text{M}$  à 10 mM sur des cultures cellulaires) (Braam, 1992; Polisensky and Braam, 1996).

Un gène de calmoduline a également été isolé en réponse au frottement d'entre-nœuds de tomate (Depège *et al.*, 1997). Dans cette étude, l'induction de l'expression de ce gène, tout comme la réponse physiologique d'arrêt de croissance, est en partie systémique : l'accumulation de transcrits est trouvée dans des entre-nœuds non sollicités mais proches de la sollicitation. En 2005, une analyse globale de type puce à ADN a été menée chez *Arabidopsis thaliana* afin d'identifier des gènes *CML* (calmoduline-like) ou *XTH* (XET/hydrolase) en relation avec le toucher ou l'obscurité. 12 *CMLs* et 4 *XTHs* montrent une induction de leur expression par le toucher et à l'inverse 3 *XTHs* une inhibition de leur expression (Lee *et al.*, 2005).

Enfin il est intéressant de noter que le calcium intracellulaire induit des modifications de la polymérisation des microtubules, pouvant ainsi modifier en retour le CPMCW (Marcum *et al.*, 1978; Berkowitz and Wolff, 1981).

### **c. Les protéines kinases**

Les protéines kinases sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) sur l'hydroxyle (groupe -OH) d'une autre protéine. Les enzymes de la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) peuvent être phosphorylées à leur tour et on trouve alors des MAPKK ou des MAPKKK (pour MAPK Kinase et MAPKK Kinase respectivement). La phosphorylation joue le rôle d'activateur de la protéine cible et cette voie permet de réguler la réponse à des stimuli externes ainsi que les activités cellulaires. Elles interviennent dans de nombreuses voies de signalisation. Il a par



exemple été montré que des phosphorylations protéiques étaient impliquées dans l'expression de *TCH3* en réponse au stress mécanique (Wright *et al.*, 2002).

Chez *Arabidopsis thaliana*, 72 des 1111 gènes codant des protéines kinases présentent une induction de leur expression 30 minutes après une sollicitation mécanique, 6 autres sont inhibés (Lee *et al.*, 2005). Une étude également menée sur *Arabidopsis thaliana* a montré l'induction de MAPK et d'une MAPKKK en réponse à une sollicitation mécanique (agitation manuelle des feuilles de la rosette) et ceci entre 10 et 40 minutes après la sollicitation (Mizoguchi *et al.*, 1996).

#### **d. Les hormones**

##### **✓ L'éthylène**

L'éthylène est une phytohormone gazeuse ayant des effets variés et étant impliquée dans de nombreuses voies de réponse aux stress chez les plantes. Elle est connue pour être impliquée dans le développement et le métabolisme (maturation des fruits, floraison, sénescence, abscission) mais également dans la réponse des plantes à de nombreux stress biotiques et abiotiques comme le stress hydrique (submersion ou sécheresse), le froid, la blessure ou les attaques de pathogènes (Bleecker and Kende, 2000).

Des études ont montré que l'éthylène jouait également un rôle dans les réponses au stress mécanique. L'application d'éthylène exogène sur des épicotyles de pois ou des entrenœuds de haricot peut amener à des modifications morphologiques et physiologiques comparables à celles de la thigmomorphogenèse (Goeschl *et al.*, 1966; Jaffe and Biro, 1977; Biro *et al.*, 1980; Erner and Jaffe, 1983). Chez le pin, une augmentation en diamètre est observée à l'endroit où on applique de l'éthylène (Brown and Leopold, 1973).

Chez le pois, il a été montré une production d'éthylène environ 10h après un stress mécanique (barrière physique gênant la croissance de l'épicotyle) (Goeschl *et al.*, 1966). Des rameaux de pin maintenus courbés ou des rameaux de pommiers (*Malus domestica*) fléchis montrent également une augmentation du contenu éthylénique de leur atmosphère interne avec un pic éthylénique au bout de 2 jours chez le pommier (Brown and Leopold, 1973; Robitaille and Leopold, 1974). Chez le haricot, des sollicitations mécaniques telles que le frottement ou la blessure, induisent une augmentation de la concentration en éthylène dans



les entre-nœuds. Cette augmentation débute 45 à 60 minutes après la sollicitation et est maximale au bout de 2 heures (Biro and Jaffe, 1984). Jaffe et Forbes (1993) rapportent un pic éthylénique plutôt tardif, au bout de 9 heures chez le pin (*Pinus taeda*) (Jaffe and Forbes, 1993).

Une augmentation rapide de la teneur en ACC (Acide 1-AminoCyclopropane-1-Carboxilique, précurseur de l'éthylène) et des activités ACC synthase et ACC oxydase sont observées après une stimulation mécanique (frottement de la tige) chez la bryone (*Bryonia dioica*) (Boyer *et al.*, 1983; De Jaegher *et al.*, 1987). Des études ont également montré l'augmentation de l'expression des gènes de cette voie de synthèse de l'éthylène chez le haricot mungo (*Vigna radiata*), la tomate, le noyer ou le peuplier (Botella *et al.*, 1995; Tatsuki and Mori, 1999; Crouzet, 2002; Martin *et al.*, 2009). L'induction de l'expression de l'ACC synthase est observable dès 10 minutes après l'application du stress mécanique et est maximale au bout de 30 minutes (Botella *et al.*, 1995; Tatsuki and Mori, 1999; Martin *et al.*, 2009). Chez la tomate, parallèlement à cette accumulation de transcrits, un pic éthylénique a été observé 1 heure après la sollicitation (toucher des feuilles).

L'analyse de puces à ADN réalisée par Lee et ses collaborateurs (2005) sur des plants d'*Arabidopsis thaliana*, montre une sur-expression de l'expression d'un gène d'ACC synthase chez les plants touchés. Chez le pêcher, une vibration électrique appliquée sur les branches 15 minutes toutes les 2 heures conduit aussi à des augmentations des teneurs en éthylène et en ACC (observations faites au bout de 24 jours de traitement) (Onguso *et al.*, 2006).

Toutes ces études suggèrent que l'éthylène pourrait être impliqué dans les réponses de croissance au stress mécanique. Cependant, des mutants d'*Arabidopsis thaliana* insensibles à l'éthylène, *etr1-3* et *ein2-1*, présentent une réponse thigmomorphogénétique et une accumulation de transcrits des gènes *TOUCH* normales en réponse à des sollicitations mécaniques (toucher des feuilles de la rosette et flexions de la tige) (Johnson *et al.*, 1998). Ceci semble indiquer que même si certains aspects de la thigmomorphogenèse peuvent être régulés par l'éthylène, beaucoup d'autres aspects de la réponse de la plante semblent être indépendants de cette voie de régulation par l'éthylène (Chehab *et al.*, 2009). Toutefois, Wright et ses collaborateurs (2002) ont montré que EIN6 (protéine de la voie de réponse à l'éthylène) serait impliquée dans la régulation de l'expression du gène *TCH3*. De même, Anten et ses collaborateurs (2006) observent des différences de réponse au stress





mécanique (flexion) pour des plants de tabac transformés insensibles à l'éthylène (*etr1-1*), notamment au niveau de la biomasse aérienne. D'autres réponses comme les propriétés mécaniques de la tige ne semblent pas affectées par cette mutation. Cette étude prouve encore que l'éthylène est bien impliqué dans une partie des réponses de croissance au stress mécanique, mais que certaines sont indépendantes de cette hormone.

### ✓ **Les jasmonates**

Les jasmonates font également partie du groupe des phytohormones. On retrouve parmi eux l'acide jasmonique et ses esters, comme le méthyle de jasmonate. Elles sont biosynthétisées à partir de l'acide linoléique (acide gras) *via* la voie des octadécanoïdes.

Le rôle des jasmonates a été démontré dans la réponse à la blessure (Schilmiller and Howe, 2005; Koo and Howe, 2009) et l'enroulement des vrilles de la bryone (Falkenstein *et al.*, 1991). Puisque ces événements ont une composante mécanique, les jasmonates pourraient donc jouer un rôle dans la mécanoperception.

Il a en effet été montré chez la luzerne que des sollicitations mécaniques liées à la manipulation des plantes amènent à une augmentation du taux de jasmonates dans l'heure suivant la stimulation (Tretner *et al.*, 2008). Dans l'étude de Lee et ses collaborateurs (2005), l'expression d'un gène de lipoxygénase (*LOX*, codant la première enzyme de la voie de biosynthèse des jasmonates) est induite par le toucher chez *Arabidopsis thaliana*. Il avait déjà été observé l'accumulation de transcrits de *LOX* en réponse à différents stress mécaniques chez le blé (*Triticum aestivum*) (Mauch *et al.*, 1997). Cette induction est rapide puisqu'elle a lieu dans la première heure suivant le stress (avec un maximum d'accumulation des transcrits au bout de 2 heures) et elle est transitoire, indiquant que les ARNs sont rapidement dégradés. Cette augmentation de l'expression de *LOX* pourrait donc amener à une augmentation de la production de jasmonates qui, à son tour, pourrait activer l'expression d'autres gènes sensibles aux jasmonates. L'accumulation des transcrits de plusieurs enzymes de la voie des jasmonates a également été montrée chez le peuplier (*Populus tremula x alba*) en réponse à une flexion contrôlée de la tige (Lakhal, 2010).



### ✓ **Autres hormones**

L'acide abscissique (ABA) est une hormone intervenant dans le développement et la réponse aux stress chez les plantes. En particulier, il provoque la fermeture des stomates en réponse à un déséquilibre hydrique de la plante (Taiz and Zeiger, 2006). Dans certains cas, les plantes soumises à un stress mécanique ferment leurs stomates (Biddington and Dearman, 1985; Biddington, 1986), ce qui pourrait éventuellement être attribué à l'ABA.

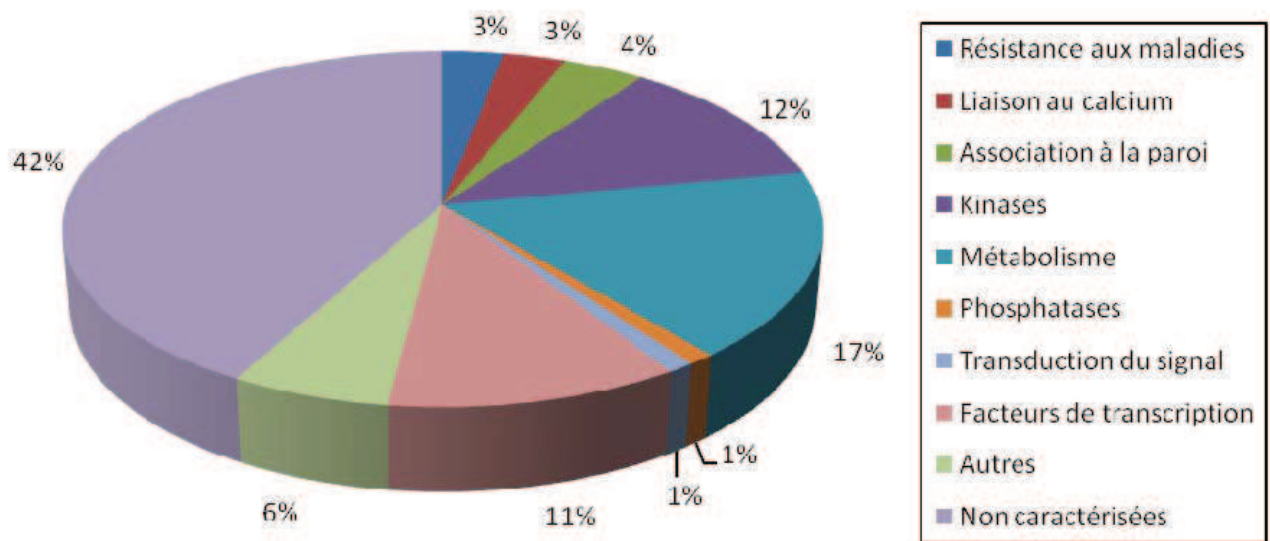
L'auxine stimule l'élongation de la tige et à faible concentration celle des racines. Elle intervient dans la ramification de la tige (rôle dans la dominance apicale), la rhizogenèse, la fructification et affecte la division cellulaire et les propriétés mécaniques de la paroi cellulaire (*via* l'acidification de la paroi) favorisant ainsi l'élongation et (Taiz and Zeiger, 2006). Elle pourrait jouer un rôle dans les modifications de croissance observées en réponse au stress mécanique. Lors de l'application d'un stimulus mécanique, il a été mis en évidence une augmentation globale de l'activité peroxydasique (impliquées dans la dégradation de l'auxine) après respectivement 2 heures chez la bryone et 1 heure chez la tomate (Boyer *et al.*, 1979; Lefèvre *et al.*, 1993). Une diminution des substances auxiniques avait déjà été observée et corrélée à cette augmentation des peroxydases basiques (Boyer, 1967). Enfin, Xu et ses collaborateurs (1995) ont montré une induction de l'expression du gène *TCH4* par l'auxine chez *Arabidopsis thaliana*.

Les brassinostéroïdes sont des phytohormones impliquées dans le développement des plantes (Taiz and Zeiger, 2006). Une induction de l'expression du gène *TCH4* (impliqué dans la réponse au stress mécanique) a été observée suite à un traitement de la plante aux brassinostéroïdes (Xu *et al.*, 1995), suggérant une possible implication de ces hormones dans la réponse au stress mécanique.

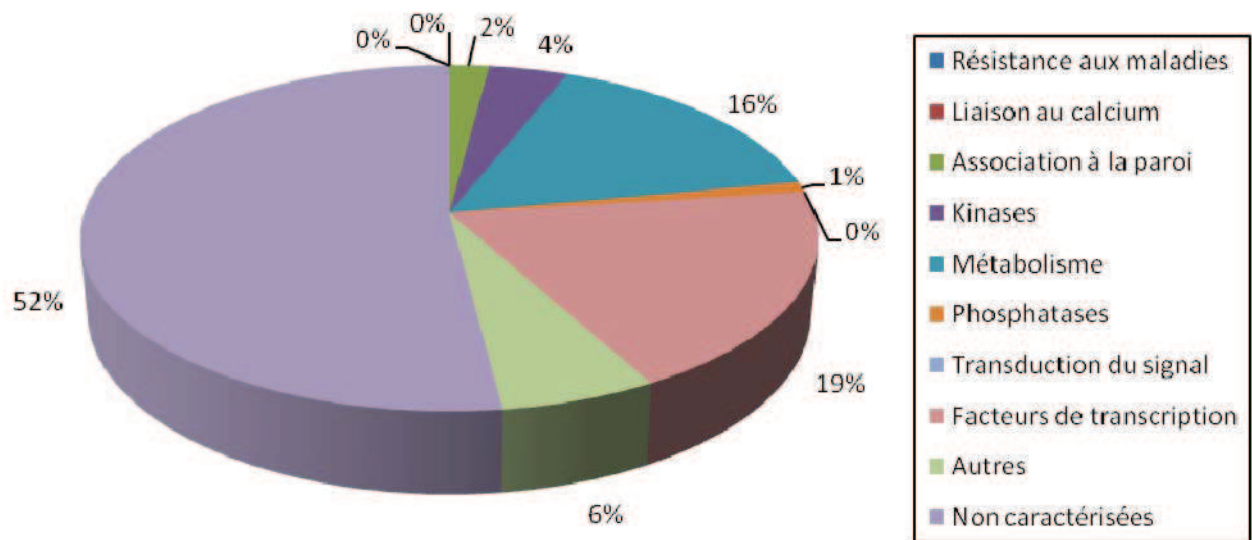
Cependant peu d'études rapportent le rôle de l'ABA, de l'auxine ou des brassinostéroïdes dans la mécanoperception et aucune ne démontre l'implication des cytokinines.

### **e. Les facteurs de transcription**

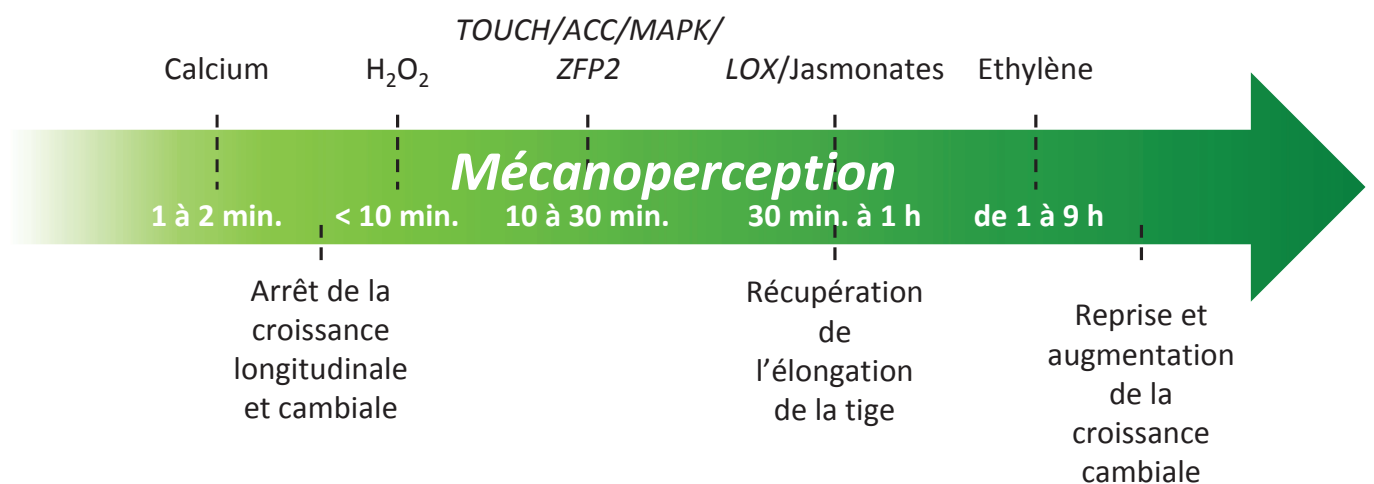
Lee et ses collaborateurs (2005) ont réalisé une approche globale par puces à ADN afin d'identifier des gènes mécanosensibles. Ils ont ainsi identifié 589 gènes dont l'expression est induite 30 minutes après une sollicitation mécanique de type flexion chez *Arabidopsis*



b



**Figure 15 : Classement et fonction des gènes dont l'expression est modifiée 30 minutes après une sollicitation mécanique** (flexion de la rosette) *chez Arabidopsis thaliana*. Les pourcentages représentent la proportion de gènes dont l'expression est induite (a) ou inhibée (b) (d'après Lee *et al.*, 2005).

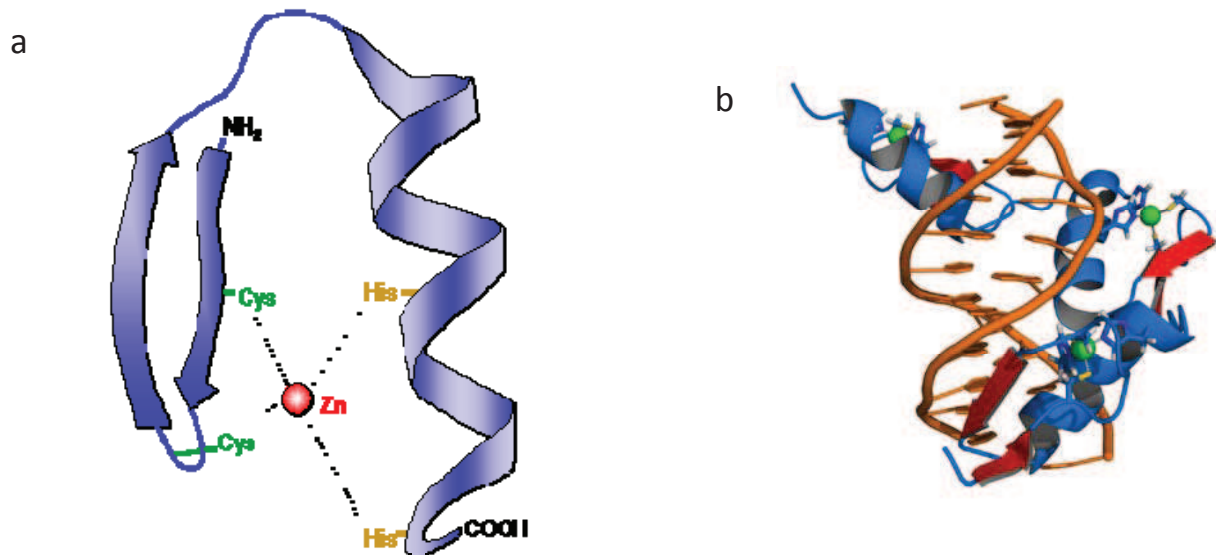


**Figure 16 : Déroulement chronologique des différentes modifications moléculaires chez les plantes suite à une sollicitation mécanique** (inspirée de Telewski 2006).

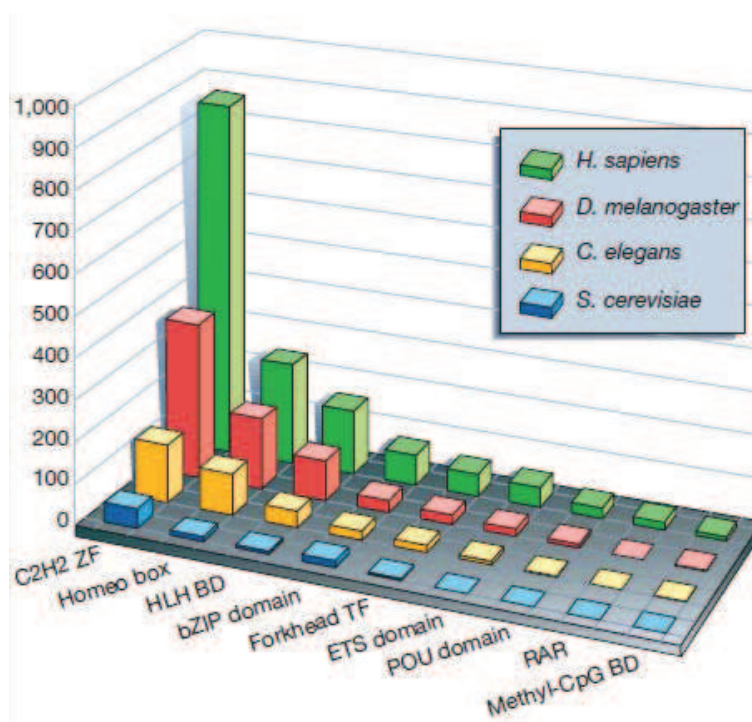
*thaliana* et 172 gènes dont l'expression est réprimée (Figure 15). Parmi ces gènes, les facteurs de transcription sont une famille de protéines intéressantes car ils sont capables de réguler la transcription d'autres gènes et sont donc des acteurs clés des voies de signalisation. Ils reconnaissent généralement de petites séquences d'ADN conservées contenues dans les promoteurs de leurs gènes cibles. Certains de ces facteurs sont capables de réguler l'expression de plusieurs dizaines de gènes différents et sont utilisés de manière constitutive, d'autres sont au contraire spécifiques de certains gènes dont l'expression est alors régulée de manière spécifique.

Chez *Arabidopsis thaliana*, 66 des 1601 gènes codant des facteurs de transcription présentent une induction de leur expression 30 minutes après une sollicitation mécanique, 33 autres sont inhibés (Lee *et al.*, 2005). La plupart des familles de facteurs de transcription sont représentées : b-zip, leucine-zipper, MYB, WRKY, protéines à doigts de zinc, à domaine AP2...

Parmi les gènes dont l'expression est la plus modifiée en réponse au toucher, on retrouve les gènes *ZAT10* et *ZAT12*, des protéines à doigts de zinc de type Cys2-His2 (C2H2). De récentes études ont révélé que ces protéines pourraient être des inhibiteurs de transcription, impliqués dans la défense et l'acclimatation des plantes à différents stress environnementaux (Sakamoto *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2004). Cependant très peu de ces facteurs de transcription ont fait l'objet d'une étude précise dans le cadre du stress mécanique. Toutefois, au PIAF, des études menées par AFLP-cDNA (Amplified Fragment Length Polymorphism) sur le noyer et visant à identifier des gènes de la réponse précoce à un stress mécanique (une flexion de la tige), ont permis d'isoler un gène codant une protéine à deux doigts de zinc de la famille des C2H2. L'expression de ce gène, nommé *Jr-ZFP2* (pour *Juglans Regia*-Zinc Finger Protein à 2 doigts de zinc), est induite fortement et rapidement (30 minutes) après une flexion contrôlée de la tige. Ce gène semble être spécifique du stress mécanique (flexion) car il ne répond pas à d'autres stress abiotiques dans les conditions testées (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008). Son homologue (*PtaZFP2* pour *Populus tremula x alba* ZFP2) a été identifié chez le peuplier ; il est également induit par la flexion (Martin *et al.*, 2009).



**Figure 17 : Modélisation 3D des protéines à doigts de zinc.** Représentation schématique de la structure d'un doigt de zinc de type C2H2 (a) et représentation schématique d'une protéine à 3 doigts de zinc (Zif268 – aussi connue sous le nom de Egr1, facteur de transcription des Mammifères initialement isolé chez la souris – représenté en bleu, les atomes de zinc sont représentés en verts) se liant à l'ADN (orange) (b).



**Figure 18 : Comparaison des familles de facteurs de transcription activateurs chez les eucaryotes.** Les tailles relatives des familles de facteurs de transcription activateurs chez *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* et *Saccharomyces cerevisiae* sont indiquées. Elles sont issues d'une analyse des protéomes eucaryotiques utilisant la base de données INTERPRO (IP) qui incorpore Pfam, PRINTS et Prosite. Les familles de facteurs de transcription montrées sont les plus importantes des 1 502 familles de protéines humaines listées par IP (d'après Tupler *et al.*, 2001).

Cette analyse bibliographique nous permet de dresser un premier bilan des acteurs précoces de la mécanoperception et de proposer une possible chronologie (Figure 16). Cependant les liens (s'ils existent) entre ces différents acteurs sont pour l'instant inconnus et restent à définir.

## F. Les protéines à deux doigts de zinc de type C2H2

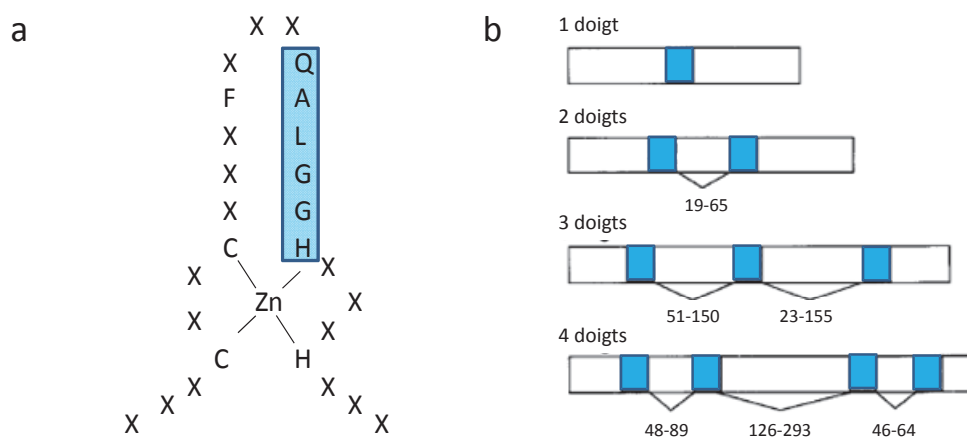
34

### 1. Généralités, structure et classification

Les protéines à doigts de zinc (ZFPs) forment un sous-ensemble des facteurs de transcription. Elles sont caractérisées par la présence de domaines en doigt de zinc (ZF) permettant l'interaction de la protéine avec l'ADN. Le terme « doigt de zinc » fait référence à un motif protéique qui se lie à un atome de zinc dans le but de stabiliser sa structure tridimensionnelle consistant en deux feuillets  $\beta$  antiparallèles et une hélice  $\alpha$  (Figure 17a). Chaque motif serait replié autour d'un atome central de zinc pour former un mini-domaine indépendant et les doigts de zinc adjacents se combineraient en modules pour former un domaine de liaison à l'ADN : le module « s'agrippe » à l'ADN, d'où le terme de doigt (Figure 17b) (Klug and Schwabe, 1995). Ce sont des résidus cystéines (Cys) et des histidines (His) qui se lient à l'atome de zinc et les ZFPs sont classées en fonction du nombre et de l'ordre des Cys et des His liant cet atome. On retrouve ainsi les C2H2, C2C2, C2HC, C2C2C2C2 et C2HCC2C2 (Ciftci-Yilmaz and Mittler, 2008).

Parmi les différents types de ZFPs, les C2H2-ZFPs constituent un des groupes de facteurs de transcription le plus abondant et le plus étudié chez les Eucaryotes (Wolfe *et al.*, 2000). Chez l'homme, 2000 facteurs de transcription activateurs potentiels ont été identifiés et les C2H2-ZFPs constituent la plus importante famille avec près de 900 membres. C'est également le cas chez la drosophile, chez le ver *Caenorhabditis elegans* et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Tupler *et al.*, 2001) (Figure 18). En effet, des analyses *in silico* ont montré qu'environ 3% de la totalité des gènes de Mammifères, 2,3% chez les Diptères, 0,8 % chez *Saccharomyces cerevisiae* et 0,7% chez *Arabidopsis thaliana* codent des C2H2-ZFPs





**Figure 19 : Structure des protéines à doigts de zinc chez les plantes.** Représentation schématique de la structure et de la séquence d'un doigt de zinc chez les plantes (la séquence conservée QALGGH est surlignée en bleu) (a) et représentation schématique de la structure des protéines de type C2H2 chez les plantes (les domaines en doigt de zinc sont représentés en bleu et le nombre d'acides aminés entre chaque doigt de zinc est noté sous chaque représentation schématique) (b) (d'après Takatsuji, 1999).

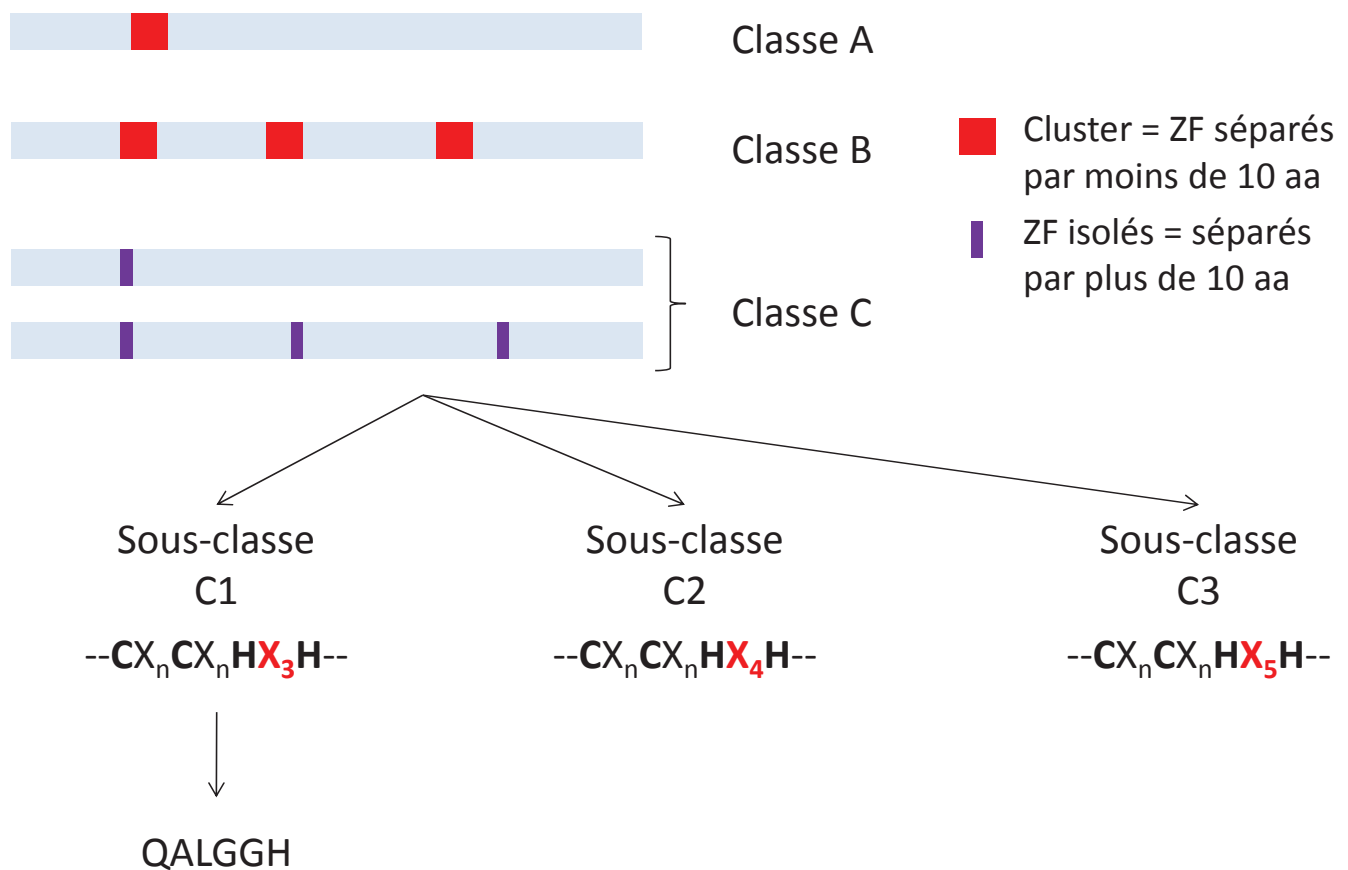
(Englbrecht *et al.*, 2004). Chez *Arabidopsis thaliana*, sur plus de 2000 facteurs de transcription identifiés (Qu and Zhu, 2006; Mitsuda and Ohme-Takagi, 2009), environ 9% sont des C2H2-ZFPs (176 C2H2-ZFPs identifiées ; (Ciftci-Yilmaz and Mittler, 2008)). Ces protéines sont également appelées protéines de type TFIIIA (Transcription Factor III A) en référence à la première protéine à doigt de zinc identifiée par Miller en 1985 chez le xénope (*Xenopus*) et qui régule l'expression du gène de l'ARNr 5S (Miller *et al.*, 1985). Chez les plantes, la première C2H2-ZFP a été identifiée chez le pétunia (*Petunia*) : ZPT2-1 (d'abord nommé EPF1) est un facteur de transcription exprimé spécifiquement dans les pétales et les graines et interagissant avec des régions spécifiques (nommées EP1 à 4) du promoteur du gène *EPSPS* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase). Ces gènes sont exprimés de façon tissu-spécifique à des stades précis du développement (Takatsuji *et al.*, 1992).

D'autres protéines de type C2H2-ZFPs ont montré une activité de facteur de transcription. C'est le cas des gènes *SUPERMAN* (*SUP*), *AZF1* à 3 et *STZ* d'*Arabidopsis thaliana*. Ainsi le gène *SUP* serait responsable de la régulation négative des gènes *APETALA3* (*Ap3*) et *PISTILLATA3* (*Pi*) : une mutation de *SUP* conduit à une sur-expression de *Ap3* et *Pi* (Sakai *et al.*, 1995). Dans le cas des gènes *AZF1* à 3 et *STZ*, les protéines correspondantes sont localisées dans le noyau et des tests de retard sur gel ont montré qu'elles sont capables d'interagir *in vitro* avec la séquence EP2 du promoteur d'*EPSPS* de pétunia (avec lequel une interaction a déjà été montrée pour ZPT2-1) *via* leurs doigts de zinc. Cependant leurs cibles *in vivo* n'ont pas été identifiées. *In vivo*, les protéines présentent une activité de type répresseurs (Sakamoto *et al.*, 2004).

Les C2H2-ZFPs sont caractérisées par une séquence conservée CX<sub>2-4</sub>CX<sub>3</sub>FX<sub>5</sub>LX<sub>2</sub>HX<sub>3-5</sub>H (où les C et H soulignés représentent les Cys et His interagissant avec l'atome de zinc). Chez les plantes, elles possèdent de 1 à 5 ZFs et deux caractéristiques distinguent la plupart de ces C2H2-ZFPs de celles des autres Eucaryotes :

- Tout d'abord, la majorité des C2H2-ZFPs de plantes contiennent un motif conservé QALGGH dans leur doigt (Figure 19a). Ce motif n'a été retrouvé chez aucun autre organisme, suggérant une évolution en association avec des régulateurs plante-spécifiques (Takatsuji, 1999).

- Ensuite, pour les ZFPs possédant plusieurs doigts, les ZFs sont séparés par de longues séquences d'acides aminés de longueur variable (Figure 19b) alors que chez les animaux ils



**Figure 20 : Schématisation des différentes classes et sous-classes de C2H2-ZFPs.** Dans les classes A et B les doigts de zinc (ZFs) sont regroupés en un ou plusieurs clusters respectivement. La classe C regroupe les protéines à un seul ZF ou avec des ZFs dispersés. Pour les classes B et C le nombre des ZFs et des clusters représentés est arbitraire. La classe C est divisée en trois sous-classes en fonction du nombre d'acides aminés séparant les deux résidus Histidines du C2H2, respectivement trois, quatre ou cinq pour les sous-classes C1, C2 ou C3. C'est dans la sous classe C1 que l'on retrouve les Q-type C2H2-ZFPs possédant le motif QALGGH (d'après Englbrecht *et al.* 2004).

sont séparés par de courtes séquences de longueur constante (sept acides aminés) (Takatsuji, 1999).

A la fois le motif QALGGH et la séquence entre deux ZFs (longueur et nature de la séquence) semblent jouer un rôle important dans l'affinité de la protéine pour sa cible ADN (Takatsuji and Matsumoto, 1996; Kubo *et al.*, 1998; Ciftci-Yilmaz and Mittler, 2008).

Les C2H2-ZFPs peuvent être divisées en trois classes en fonction du nombre et de l'arrangement des ZFs (Böhm *et al.*, 1997; Englbrecht *et al.*, 2004). Dans une étude globale du génome d'*Arabidopsis thaliana in silico*, Englbrecht et ses collaborateurs (2004) distinguent deux classes A et B comprenant les ZFPs dont les doigts sont arrangés en un ou plusieurs petits groupes (clusters) respectivement et une classe C regroupant les ZFPs avec un seul ZF ou des ZFs dispersés (les doigts sont considérés comme dispersés et non en cluster lorsqu'ils sont séparés par plus de dix acides aminés). Ces classes se retrouvent également chez la levure (Böhm *et al.*, 1997). Si la plupart des C2H2-ZFPs des animaux et des levures se retrouvent dans les classes A et B (rappelons que leurs ZFs sont séparés par de courtes séquences), chez les plantes on retrouve majoritairement des ZFPs de la classe C (plus de 80% des C2H2-ZFPs d'*Arabidopsis thaliana*, 143 protéines parmi les 176 C2H2-ZFPs identifiées). Cette classe C peut à son tour être divisée en trois sous-classes C1, C2 et C3. Ces trois sous-classes diffèrent par le nombre d'acides aminés séparant les deux His du ZF : respectivement trois, quatre ou cinq. Chez *Arabidopsis thaliana*, plus de la moitié des C2H2-ZFP de classe C se retrouvent dans la sous-classe C1 (77 protéines sur 143) et parmi celles-ci 85% contiennent le motif QALGGH (soit au final quasiment 40% des C2H2-ZFPs d'*Arabidopsis thaliana*) (Englbrecht *et al.*, 2004). La Figure 20 schématise ces différentes classes et sous-classes. Ces protéines contenant le motif QALGGH ont été qualifiées de « Q-type » chez le riz (Agarwal *et al.*, 2007). Les analyses *in silico* ont ainsi identifié 64, 99 et 47 Q-type C2H2-ZFPs chez *Arabidopsis thaliana*, le riz et le blé respectivement (Englbrecht *et al.*, 2004; Agarwal *et al.*, 2007; Kam *et al.*, 2008).



## 2. Motifs conservés

Les Q-type C2H2-ZFPs possèdent des motifs plus ou moins conservés. Ces motifs conservés sont le reflet de la fonction, de la localisation ou du comportement partagés entre les différentes protéines de cette famille.

Le motif QALGGH est conservé dans les ZFs. Ce motif joue un rôle important dans l'interaction de la protéine avec son ADN cible et chaque acide aminé semble être essentiel. Ainsi, une substitution d'un quelconque résidu A, L, G, G ou H du premier doigt de la protéine ZPT2-2 de pétunia résulte en une perte totale de la capacité de la protéine à se fixer à l'ADN ; la substitution du résidu Q la réduit significativement (Kubo *et al.*, 1998; Sakamoto *et al.*, 2004). De la même façon, la substitution du second résidu G du ZF unique de la protéine SUPERMAN d'*Arabidopsis thaliana* amène à une perte de fonction de la protéine (Sakai *et al.*, 1995). Il a été montré grâce à des tests de retard sur gel, chez le pétunia puis chez *Arabidopsis thaliana*, que les C2H2-ZFPs seraient capables de reconnaître des petites séquences d'ADN de type AGT disposées en tandem et que la spécificité de la séquence entre ces deux motifs AGT serait responsable de l'affinité de la protéine avec l'ADN (Takatsuji and Matsumoto, 1996; Yoshioka *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2004).

Des études récentes soulignent l'importance d'une activité de répression des C2H2-ZFPs. Ces protéines semblent acquérir leur activité de répression *via* un motif conservé : le domaine EAR pour ERF (Ethylene-Responsive element binding Factor) - Amphiphilic Repression domain (Ohta *et al.*, 2001; Kazan, 2006; Kagale *et al.*, 2010). Ce domaine se caractérise par une séquence conservée  $^L/_F\text{DLN}^L/_F(x)\text{P}$  et est ainsi également nommé la DLN-box. Une analyse globale du génome d'*Arabidopsis thaliana* montre que 56 protéines de type C2H2 possèdent cette DLN-box, certaines possédant même plus d'une fois le motif (Kagale *et al.*, 2010). Sur 78 sites identifiés dans ces 56 protéines, 60% (47) sont du type LxLxL et 31% (24) sont DLNxxP, les 9% restant sont un recouvrement des deux. Parmi les protéines possédant ce domaine EAR, les C2H2-ZFPs sont les plus représentées (Kagale *et al.*, 2010). Chez *Arabidopsis thaliana*, la majorité des motifs EAR est retrouvée en région C-terminale (59 sites) mais certains sont trouvés en région N-terminale (14 sites), voire au milieu de la protéine (5 sites). Le motif EAR de la protéine ZAT7 d'*Arabidopsis thaliana*



semble jouer un rôle crucial dans la réponse de la plante au stress salin et ceci *via* son interaction avec les facteurs de transcription WRKY70 et HASTY (Ciftci-Yilmaz *et al.*, 2007).

D'autres motifs conservés, plus ou moins bien décrits, sont retrouvés chez les C2H2-ZFPs. On peut évoquer la B-box (avec un motif conservé KXKRSKRXR) située du côté N-terminal et la L-box riche en Leucine (EXEXXAXCLXXL) située généralement entre la B-box et le premier ZF (Sakamoto *et al.*, 2000).

Alors que la B-Box semble être un signal de localisation nucléaire (NLS – Nuclear Localization Signal), la L-box et la DLN-box semblent jouer un rôle dans l'interaction protéine-protéine ou dans le maintien de la structure repliée (Sakamoto *et al.*, 2000).

### 3. *Fonctions des C2H2-ZFPs*

D'abord considérées exclusivement comme des facteurs de transcription (d'où leur nom Transcription Factor IIIA) se liant de façon séquence-spécifique à l'ADN, les protéines à doigts de zinc au sens large sont maintenant connues pour reconnaître aussi des ARN et des protéines (Brown, 2005; Gamsjaeger *et al.*, 2007). Cependant, la plupart des études se limitent encore au rôle « facteurs de transcription » de ces protéines. De récentes études sur les C2H2-ZFPs montrent leur rôle dans le développement et l'organogenèse mais également dans les voies de défense et de réponse des plantes aux stress. Ici nous évoquerons seulement les Q-type C2H2-ZFPs.

#### a. Implication dans le développement

Parmi les Q-type C2H2-ZFPs, le gène *SUPERMAN (SUP)* d'*Arabidopsis thaliana* est le plus étudié et ne possède qu'un seul ZF. Ce gène est responsable de la coordination des cellules méristématiques entre elles afin de définir celles qui donneront le carpelle et les étamines et donc du maintien de la frontière entre les verticilles 3 et 4 de la fleur (Sakai *et al.*, 1995). Un orthologue de *SUP* a été identifié chez le pétunia et joue également un rôle dans le développement floral (Nakagawa *et al.*, 2004). Une autre C2H2-ZFP à un doigt de zinc a été identifiée chez le pétunia : LIF (Lateral shoot Inducing Factor) affecte le métabolisme des



Espèce	Gène	Stress modifiant l'expression du gène	Molécules régulant l'expression du gène	Références
<i>Arabidopsis</i>	AZF	froid, stress salin, hydrique	ABA, gibbérellines, jasmonates, acide salicylique, cytokinines, auxines	Sakamoto <i>et al.</i> , 2004 ; Chinnusamy <i>et al.</i> , 2006
	ZAT7	stress salin	/	Ciftci-Yilmaz <i>et al.</i> , 2007
	ZAT10/STZ	froid, stress salin, hydrique, stress osmotique, oxydatif	ABA, gibbérellines, jasmonates, acide salicylique, cytokinines, auxines	Mittler <i>et al.</i> , 2006 ; Chinnusamy <i>et al.</i> , 2006
	ZAT12	stress thermique, osmotique, salin, lumineux	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Davletova <i>et al.</i> , 2005 ; Chinnusamy <i>et al.</i> , 2006
<i>Petunia hybrida</i>	ZPT2-3	stress hydrique, froid, blessure	ACC, jasmonates	Sugano <i>et al.</i> , 2003
<i>Glycine max</i>	SCOF-1	froid	ABA	Kim <i>et al.</i> , 2001
<i>Capsicum annuum</i>	CAZFP1	défense contre les pathogènes, blessure, stress salin, froid	éthylène, jasmonates, ABA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , acide salicylique	Kim <i>et al.</i> , 2004
<i>Thellungiella halophila</i>	ThZF1	stress salin, hydrique	/	Xu <i>et al.</i> , 2007
<i>Oryza sativa</i>	ZFP182	froid, stress salin	ABA	Huang <i>et al.</i> , 2007
<i>Triticum aestivum</i>	TaZFP	stress hydrique	ABA, sucrose	Kam <i>et al.</i> , 2008
<i>Catharanthus roseus</i>	ZCT	éliciteurs des champignons	jasmonates	Pauw <i>et al.</i> , 2004
<i>Juglans regia</i>	Jr-ZFP2	stress mécanique		Leblanc-Fournier <i>et al.</i> , 2008
<i>Populus trichocarpa</i>	PtaZFP2	stress mécanique, froid, blessure	?	Martin <i>et al.</i> , 2009

**Tableau 1 : Rôle et molécules régulant l'expression des gènes codant des C2H2-ZFPs identifiées chez différentes espèces.**

cytokinines et la forme des plantes (Nakagawa *et al.*, 2005). En effet, les plants sur-exprimant le gène *LIF* présentent une ramification plus développée et sont plus petits que les plants sauvages ; ils possèdent moins de cellules mais de plus grande taille dans la tige, les feuilles et les fleurs (Nakagawa *et al.*, 2005).

Une étude visant à caractériser des Q-type C2H2-ZFPs chez *Arabidopsis thaliana* montre que les gènes codant les protéines ZAT1, ZAT5, ZAT7, ZAT10, ZAT11 et ZAT12 (qui toutes possèdent deux ZFs à l'exception de ZAT1 qui en possède trois) sont différentiellement exprimés dans les organes, mais ne démontre pas leur implication dans des processus différents (Meissner and Michael, 1997). Dinkins et ses collaborateurs (2003) retrouvent également une distribution particulière de l'expression du gène *ZFP11* d'*Arabidopsis thaliana* (un gène *SUPERMAN*-like, un seul ZF) : il est faiblement exprimé dans les fleurs, les méristèmes axillaires, les racines et les tiges alors qu'il est absent dans les feuilles. Aucun plant d'*Arabidopsis thaliana* sur-exprimant *ZFP11* n'a pu être régénéré ; l'expression ectopique de ce gène chez le tabac conduit à des plants nains, avec une morphogenèse de la feuille anormale et des fleurs précoces, et la majorité des plants sont stériles ; ces résultats révèlent le rôle important de cette protéine dans le développement de la plante. Le gène *KNUCKLES* d'*Arabidopsis thaliana* (un seul ZF) est retrouvé dans les primordia de carpelles en cours de développement puis dans les étamines et les ovules des bourgeons floraux ; il aurait un rôle en tant que répresseur de la prolifération cellulaire qui régule la détermination florale (Payne *et al.*, 2004). Le gène *RABBIT EARS* (*RBE*) d'*Arabidopsis thaliana* (*SUP*-like, un seul ZF) régule lui le développement des pétales et joue probablement un rôle dans le développement précoce du primordium du deuxième verticille (Takeda *et al.*, 2004). Toujours chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes *JAGGED* et *NUB* (*NUBBIN*) (un seul ZF) stimulent la croissance des sacs polliniques ainsi que celle de la paroi des carpelles entourant les ovules (Dinneny *et al.*, 2006).

#### **b. Implication dans la réponse aux stress**

L'implication de nombreuses Q-type C2H2-ZFPs a été montrée dans la réponse à divers stress environnementaux. Le tableau 1 récapitule l'implication des différentes C2H2-ZFPs dans la réponse aux stress et les molécules signal identifiées comme intervenant dans leur

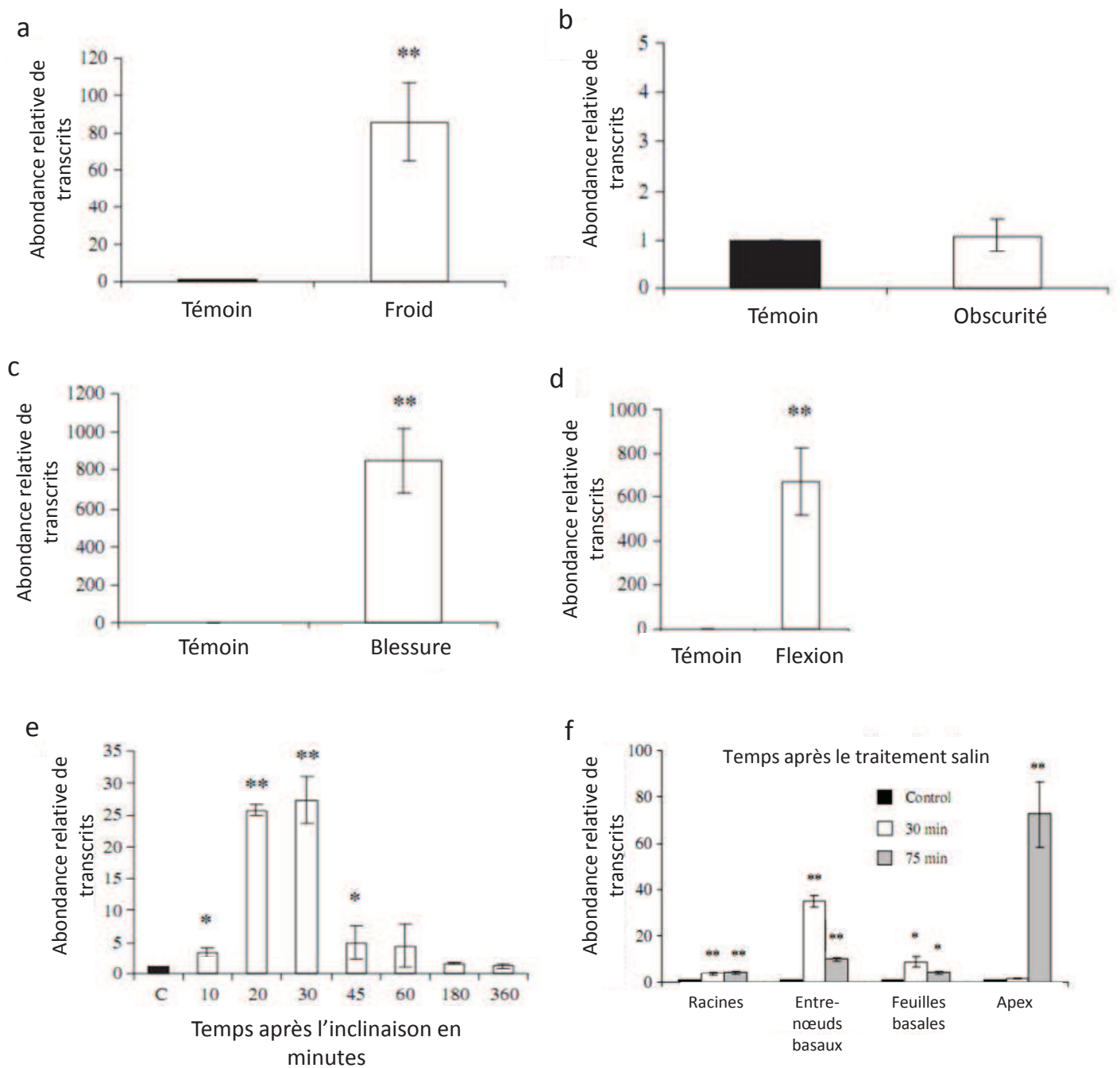
PtaZFP2	---MKRDRE--QVE-----LDLAKCLMLLSKVG	EADHEILTSYRPA	AAAAATAGAGAGAGRSFSCKTCDKNF
PtZFP2	---MKRERE--QAE-----LDLAKCLMLLSKVG	EADHEILTNYR	SAAAA-TAGTGAGAGRSFSCKTCDKNF
ZAT 12	-MVAISEIKSTVD-----VTAANCLMLLSRVG	QEN-----	VDGGDQKRVFTCKTCLKQF
ZCT1	-MGVKRFRE-EQ-----SANCLMLLSKVG	LLS-----	EMEKSAVPALKPGAGGRIYECKTCKKQF
ZPT2-12	MSAMKRSREDRQVEAA---AMANCLMLLSKLNDKS	-----	TSTTTTNQDHHNDFECKTCNKRF
JrZFP2	-MAMKRMSEDIVGDKDSLDDMAKCLMLLSHG	-GGLTTD-----	TKPKTCPPHPVDVFECKTCNRQF
ZAT 11	---MKRERSDFEESLKN--IDIAKCLMILAQTSMVKQIG	-----	LNQHTESHTSNQFECKTCNKRF
	B-box	L-box	
PtaZFP2	PSFQALGGHRASHKPKLMESTGNLLKLPN-	SPSKPKTHQCSICGLEFPLGQALGGHMRRHR	APNNVDTT
PtZFP2	PSFQALGGHRASHKPKLMESTGNLLKLPN-	SPSKPKTHQCSICGLEFPLGQALGGHMRRHR	ATNNVDTT
ZAT 12	HSFQALGGHRASHKKPNDALSSGLMKKVK-	TSS---HPCPICGVEFPMGQALGGHMRRHR	NESGAAGG
ZCT1	LTfqALGGHRASHKkLRlMAAD--LLHQSL-	AVTKPKTHACsICGLEFPLGQALGGHMRRHR	G-----
ZPT2-12	SSFQALGGHRASHKRPKLLIGAGEFLVQP----	SSKkMHECSICGMEFSLGQALGGHMRRHR	AAID----
JrZFP2	SSFQALGGHRASHKRPRLMGEEHKVDRTKLQSSGNKPKMHECSL	CGQKFSMGQALGGHMRRHR	ANEG----
ZAT 11	SSFQALGGHRASHKPKKLtVEQDKVKHLSNDYKGN--HFHkCSICSQSFGTGQALGGHMRRHR	SSMT----	
	1 <sup>er</sup> doigt de zinc	2 <sup>ème</sup> doigt de zinc	
PtaZFP2	SNSSKDHELAAVTQPPFLPEAVPVLKRSNSSKRVLC-----	LDLSLALPMYQNDSELQLEKVARPMLRCFI	
PtZFP2	SNSSKEHELAAVTQPPFLPEAVPVLKRSNSSKRVLC-----	LDLSLALPMYQNDSELQLEKVARPMLRCFI	
ZAT 12	-----ALVTRALLPEPTVTTLKKSSSGKRVAC-----	LDLSLGMVDNLNLKLELGRTVY-----	
ZCT1	--AALDGEKPVVSDKPVAKAVPFLMRSNSSKRIFGFEVDGLDLNLTPEDNDPDERDKFPPLLEFFV----		
ZPT2-12	-----EKSKAATKAMMI PVLKKSNSSKRIFC-----	LDLNLTPRNEDVDLKLWPTAPISSPVLRI	F
JrZFP2	-----LSSIMNPLDHAKVPMLMKRSNSTRVVCS-----	LDLNLTPLENDLKLFLG-KMAPKVDLRLMI	
ZAT 11	-----VEPSFISPMIPSMPLKR-CGSSKRILS-----	LDLNLTPLENDLEYIFGKTFVPKIDMKFVL	
		DLN-box	

**Figure 21 : Comparaison de la séquence protéique de PtaZFP2 avec d'autres protéines à deux doigts de zinc de *Populus trichocarpa* (PtZFP2), *Catharanthus roseus* (ZCT1), *Petunia hybrida* (ZPT2-12), *Juglans regia* (JrZFP2) et *Arabidopsis thaliana* (ZAT11). Les résidus conservés parmi les 7 séquences ou au moins 4 des 7 sont en rouge ou en vert respectivement (d'après Martin *et al.*, 2009).**

régulation. Contrairement aux protéines impliquées dans le développement, la plupart de ces C2H2 possèdent deux doigts de zinc.

En 2001, un gène codant une Q-type C2H2-ZFP et spécifiquement induit par le froid est identifié chez le soja. Ce gène *SCOF-1* n'est pas régulé par la sécheresse ou le stress salin et sa sur-expression augmente la tolérance au froid chez des plantes transgéniques (Kim *et al.*, 2001). Chez le pétunia, le gène *ZPT2-3* est régulé par le froid, la sécheresse et la blessure mais des plantes sur-exprimant ce gène sont plus tolérantes seulement à la sécheresse (pas de modifications pour le froid et les attaques de pathogènes) (Sugano *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'expression d'*AZF2* et *STZ* (aussi nommé *ZAT10*) est fortement induite par le froid, le stress salin, la sécheresse ; les gènes *AZF1* et *AZF3* le sont aussi mais dans une moindre mesure et des plants sur-exprimant *ZAT10* sont plus résistants à la sécheresse (Sakamoto *et al.*, 2004). *AZF2*, *STZ/ZAT10* et *ZAT12* interviendraient dans la réponse au froid (Chinnusamy *et al.*, 2006) ; la sur-expression de *STZ/ZAT10* induit l'expression de gènes de la voie de défense aux EAO et augmente la tolérance des plantes aux stress salin, thermique et osmotique mais de manière intéressante, des plants *knockout* ou RNAi présentent également une tolérance aux stress osmotique et salin (Mittler *et al.*, 2006) et des plants sur-exprimant *ZAT7* sont également plus résistants au stress salin (Ciftci-Yilmaz *et al.*, 2007). Finalement l'expression de *ZAT12* est induit par les stress thermique (froid ou chaleur), salin, hydrique, oxydatif et la blessure et des plants transgéniques (sous- ou sur-exprimant *ZAT12*) ont confirmé son rôle dans les stress oxydatif, osmotique, salin, lumineux et thermique (Davletova *et al.*, 2005). Chez *Thellungiella halophila*, une plante halophyte proche d'*Arabidopsis thaliana*, *ThZF1* serait impliqué dans les réponses aux stress hydrique et salin et ce gène est capable de compléter le gène *AZF2* muté chez des plants d'*Arabidopsis thaliana* (Xu *et al.*, 2007). Chez le riz, *ZFP182* est induit par le froid et le stress salin, et sa sur-expression confère une résistance au sel (Huang *et al.*, 2007). Les gènes de la famille *TaZFP* du blé sont induits par un stress hydrique (Kam *et al.*, 2008).

Le gène *CAZFP1* du poivron (*Capsicum annuum*) est impliqué dans la défense contre les pathogènes (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) et son expression est induite par la blessure, le froid et le sel ; des plantes sur-exprimant ce gène présentent une tolérance aux infections bactériennes et à la sécheresse (Kim *et al.*, 2004). Les gènes *ZTCs* de la pervenche



**Figure 22 : Etude de l'expression du gène *PtaZFP2*.** Accumulations de transcrits de *PtaZFP2* en réponse à un traitement froid (tiges, 1h, 4°C) (a), obscurité (tiges, 1h) (b), blessure (feuilles ciselées, 1h) (c), flexion (tiges, 30min) (d) ou cinétique d'accumulation des transcrits suite à un stress gravitationnel (tiges, inclinaison à 35°) (e) ou à différents temps dans différents organes après un traitement salin (NaCl 200 mM) (f). Les astérisques (\*) ou doubles astérisques (\*\*) représentent des tests de Student significatifs à  $P < 0,05$  et  $P < 0,01$  respectivement (d'après Martin *et al.*, 2009) .

(*Catharanthus roseus*) sont impliqués dans la voie des alcaloïdes (réponses aux éliciteurs des champignons) (Pauw *et al.*, 2004).

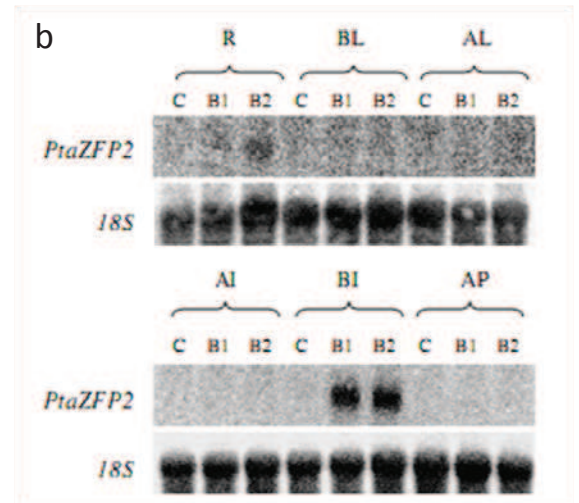
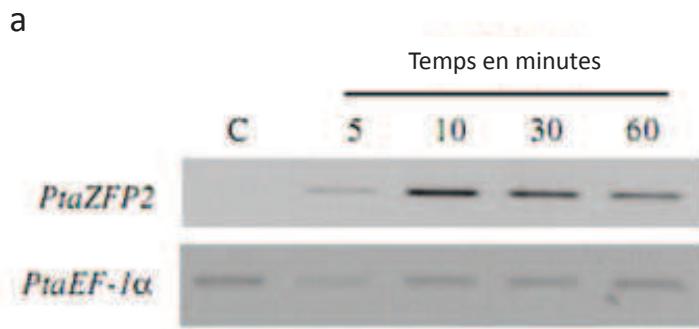
Toutes ces études suggèrent que les C2H2-ZFPs ne seraient pas spécifiques à un seul type de stress mais permettraient de réguler la réponse à plusieurs stress.

#### 4. Le gène de peuplier *PtaZFP2*

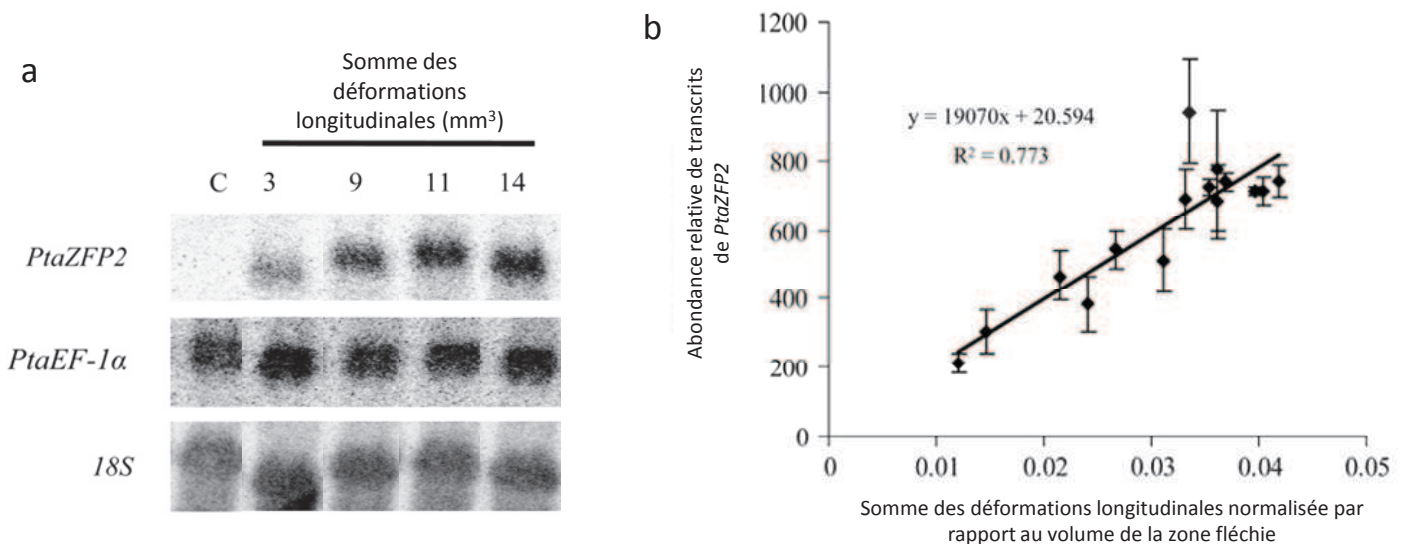
41

Le gène *PtaZFP2* a été identifié et caractérisé chez le peuplier (*Populus tremula x alba*) comme répondant à la sollicitation mécanique. Il code une Q-type C2H2-ZFP à deux ZFs dans laquelle on retrouve des motifs conservés B-box, L-box et DLN-box et présentant des homologies de séquence avec des Q-type C2H2-ZFPs de pétunia, de pervenche, d'*Arabidopsis thaliana* et d'une autre sous-espèce de peuplier (*Populus trichocarpa*) (Figure 21) (Martin *et al.*, 2009). Parmi ces protéines, ZAT12 d'*Arabidopsis thaliana* a déjà été caractérisée comme intervenant dans les stress oxydatif, thermique, osmotique, salin et lumineux (Davletova *et al.*, 2005). L'expression de *PtaZFP2* est régulée par le froid, la blessure, la flexion, la gravité, le stress salin mais pas par l'obscurité (Figure 22) (Martin *et al.*, 2009). Contrairement à *Jr-ZFP2*, comme de nombreuses C2H2-ZFP qui ne sont pas spécifiques à un seul stress, il n'est donc pas spécifique à la flexion. Par contre, en réponse à un stress mécanique comme la flexion, une accumulation importante, rapide et transitoire des transcrits de *PtaZFP2* est observée : dès 5 minutes après la flexion de la tige, les transcrits s'accumulent fortement jusqu'à 30 minutes puis reviennent à un niveau de base dans les 2 heures (Figure 23a). Ces résultats font de *PtaZFP2* un gène « mécanosensible » intéressant. Son expression semble localisée à la zone fléchie et n'est pas systémique dans les conditions testées (Figure 23b) (Martin *et al.*, 2009).

Rappelons que, lors d'un stress mécanique, ce qui est perçu par la plante est la somme des déformations longitudinales (Coutand and Moulia, 2000). De manière intéressante, il existe une corrélation positive entre la somme des déformations appliquées le long de la tige du peuplier fléchi et l'accumulation des transcrits de *PtaZFP2* (Figure 24) mais également avec la croissance radiale mesurée (Coutand *et al.*, 2009).



**Figure 23 : Etude de l'expression de *PtaZFP2* en réponse à une flexion de la tige de peuplier.** Analyse par RT-PCR de l'accumulation au cours du temps des transcrits de *PtaZFP2* après une flexion de la tige (a) et analyse par Northern-blot de l'accumulation des transcrits de *PtaZFP2* dans différents organes, 1h après une flexion de l'entre-nœud basal : R = racines, BL = feuilles basales, AL = feuilles apicales, Al = entre-nœuds apicaux (1 cm sous l'apex), B1 = entre-nœuds basaux fléchis (10 cm au-dessus du collet) et AP = apex (b). Les gènes *EF-1α* et *18S* sont utilisés en référence (d'après Martin *et al.*, 2009).



**Figure 24 : Relation entre le niveau de transcrits de *PtaZFP2* dans des tiges de peuplier et l'intensité de la sollicitation mécanique.** Expression de *PtaZFP2* par Northern blot en fonction de la somme des déformations longitudinales appliquée (a) et corrélation entre la somme des déformations longitudinales normalisées en fonction du volume de la tige fléchie et l'accumulation des transcrits de *PtaZFP2* mesurée par RT-qPCR. Les gènes *EF-1α* et *18S* sont utilisés en référence (d'après Coutand *et al.*, 2009).

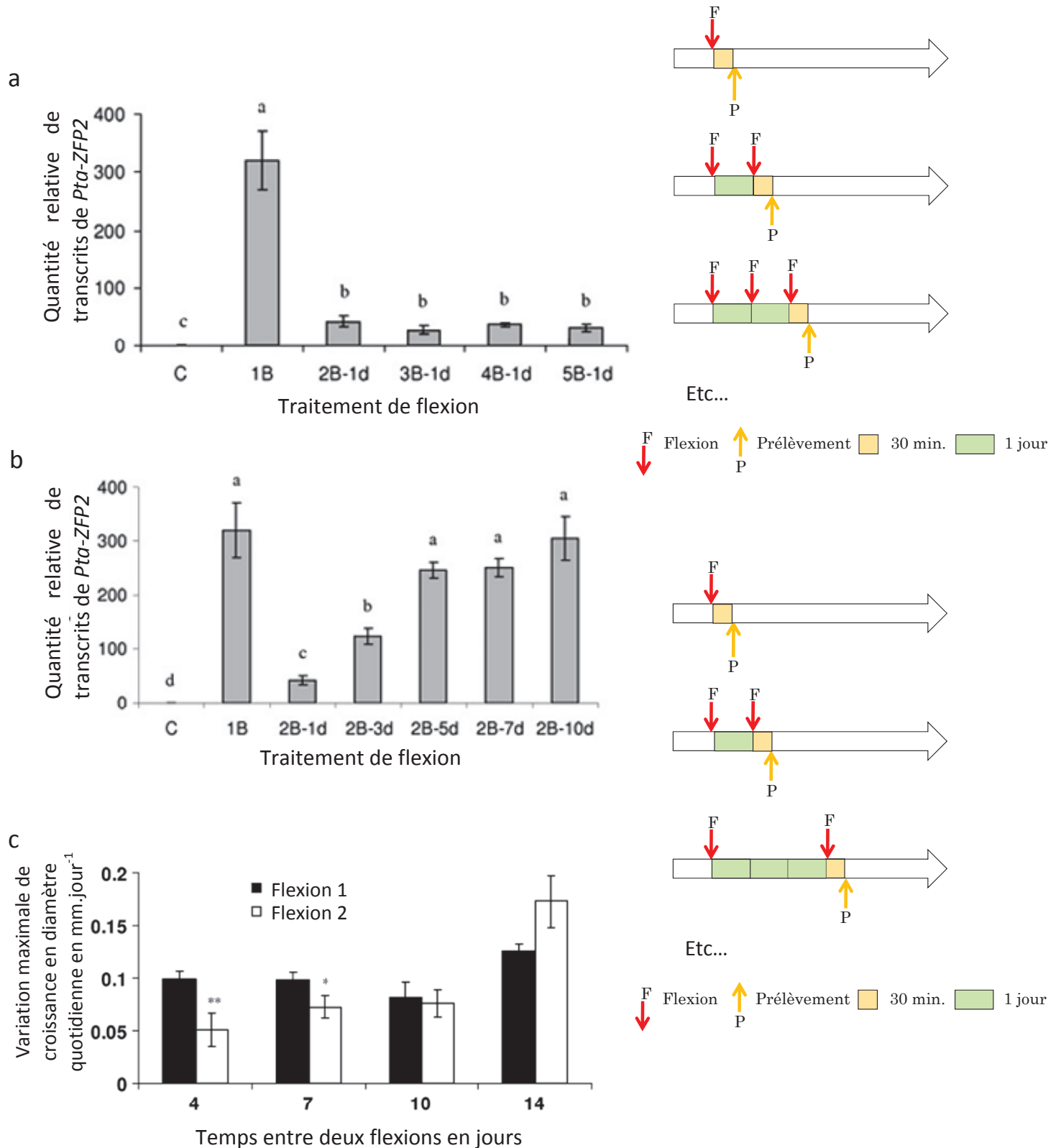


Toutefois l'effet du vent ne peut pas être limité à l'étude d'une flexion unique car l'arbre ne répond pas à chaque flexion par une diminution de croissance longitudinale et une augmentation de diamètre. Si c'était le cas, dans la nature nous observerions systématiquement des arbres nains. Ce n'est pas le cas car la plante semble s'acclimater à son environnement. C'est-à-dire qu'elle « s'endurcit » aux contraintes rencontrées de façon durable dans son environnement. Seule une sollicitation ponctuelle ou plus intense serait alors perçue comme un stress mécanique. Pour tenter de comprendre ce phénomène d'accommodation, l'effet de plusieurs flexions séparées d'un délai plus ou moins long a été étudié. L'accumulation des transcrits de *PtaZFP2* est moins importante pour des flexions répétées et il faut entre 3 et 5 jours entre deux flexions pour observer une accumulation de transcrits semblable à celle d'une flexion unique (Figure 25a et 25b). De la même manière, la réponse de croissance (augmentation de la croissance radiale) diminue si deux flexions successives sont appliquées et il faut entre 7 et 10 jours de délai entre les deux flexions pour avoir une réponse de croissance similaire à une flexion unique (Figure 25c) (Martin *et al.*, 2010).

L'ensemble des caractéristiques d'expression de *PtaZFP2* en réponse aux sollicitations mécaniques témoigne qu'il semble être un bon marqueur moléculaire des étapes précoces de réponse au stress mécanique chez le peuplier ainsi que du phénomène d'accommodation.

Le promoteur de *PtaZFP2* a été séquencé (1512 pb) et une analyse dans le logiciel PLACE a fait ressortir plus de 330 boîtes de réponse potentielles. Parmi celles-ci, on retrouve des boîtes de réponse spécifiques à différents stress abiotiques (obscurité, déshydratation, blessure, UV...), au calcium, aux calmodulines ou aux hormones (acide abscissique, gibbérellines, éthylène) (Figure 26). On pourra citer les W-box répondant à la blessure ; les GARE répondant aux gibbérellines ; les MYC-box qui sont des sites de liaison à des facteurs de transcription MYC impliqués dans la réponse à de nombreux stress abiotiques (froid, stress hydrique, stress salin, ABA, jasmonates) ; les ABREATCAL (ABRE-like sur la Figure 26) qui sont des boîtes de réponse dont le motif est proche de celui des ABRE (boîtes de réponse à l'acide abscissique) mais qui présentent une relation avec le calcium : leur présence est suffisante pour activer l'expression du gène par le calcium ; des motifs CGCG identifiés





**Figure 25 : Phénomène d'accommodation : effet de flexions répétées.** Effet du nombre de flexions sur l'expression de *PtaZFP2* (a) et du délai entre deux flexions successives sur l'expression de *PtaZFP2* (b) et sur la croissance en diamètre (c). Les traitements appliqués sont schématisés sur la droite. En (a) et (b) : 1B, 2B, 3B, 4B et 5B représentent des traitements de 1, 2, 3, 4 ou 5 flexion(s) respectivement, 1d, 3d, 5d, 7d et 10d représentent des délais de 1, 3, 5, 7 ou 10 jours entre les deux flexions respectivement. Les lettres représentent des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre les différents traitements (test de Newman-Keuls), les astérisques (\*) et doubles astérisques (\*\*) représentent des différences significatives à  $P < 0,1$  et  $P < 0,05$  respectivement (test de Kruskal-Wallis) (d'après Martin *et al.*, 2010).

comme des sites de liaison spécifiques de AtSR1, une protéine contenant un domaine de liaison aux calmodulines (Lorenzo *et al.*, 2004; Kaplan *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2009).

Toutes ces boîtes identifiées *in silico* ne sont pas forcément fonctionnelles : on trouve par exemple des boîtes de réponse à l'obscurité alors que l'expression de *PtaZFP2* ne semble pas influencée par celle-ci. Inversement on trouve des boîtes de réponse à la déshydratation ou à la blessure et *PtaZFP2* est bien induit par ces facteurs (Martin *et al.*, 2009). Ces éléments *cis* identifiés et spécifiques du calcium (ou des calmodulines), de l'éthylène, des gibbérellines, de l'acide abscissique, etc. sont de bonnes pistes pour étudier la régulation du gène *PtaZFP2* et donc les étapes précoces de la voie de signalisation du stress mécanique puisque l'implication de ces molécules dans la thigmomorphogenèse a déjà été montrée (cf. § E. Perception et transduction du signal mécanique, 2. Les molécules intervenant dans la transduction du signal mécanique).

-1511 *Pyrimidine box* *GT1-Core* *W-box* *MYBIAT* *GT1-Core*  
 AAGGAAAAAACAATAATGGGTTAAACCAGAAATTAAGCTAACTCGTCAAACCAGGTTAACCTGTCAAAT  
 -1437 *I-box* *SURE*  
 CCGGAATCCGTGTTATGAAAGTTTGATAACTAAATAGAAAAAATTTAACATCAACAATTTAAATTAAACAAAA  
 -1363 *Pyrimidine box* *MYBIAT*  
 AAAATTAATTTAAAGGAAAAAAGCAAAAAAATTAACAAGTTAACTCGTCAAACCAAGTTAACCTGTAA  
 -1289 *GARE*  
 ACCCTGGATCCGTGTCATGAATGTCTGGTAACTAAATAAATAAAAAAGTTAACATTAACAACTGAACTAAAC  
 -1215 *GT1-Core*  
 GAAAAAATTAATTAAGAAAAAATCTGGGTTAACTTGTCAAATCATGTTAACCTCGTTAAACCCAGGATC  
 -1141 *GARE*  
 TATGTCATGAAATTTAATAACTAAATAAAAAAATTAACATTAACAACTAAATTAACAAAAAATTTATG  
 -1067 *W-box* *MYBIAT* *GT1-Core*  
 AAAATAAAAAATAAATAAATAATTTGACGGGTCAACCCAGAAATTAATTTGGGTTCAACCGTGAACCCAGGTTAAAC  
 -993 *MYBIAT* *GT1-Core* *MYBIAT* *GT1-Core* *DOF*  
 CGGAAACCGGTTAAACCCGGAACCCAGGTTAAACCCGTGAAACTCGGGATATGTGTCTTTGAAAGTTTAATACTA  
 -919 *DOF* *GARE* *DOF*  
 AATAGAAAGAAATTTAACATTAACAACTAAACTAAACGAAAAAATTAATTAAGAAATAAAAAATAAATTA  
 -845 *MYB-consensus* *DOF*  
 GATTAACCCGTTAAATCCAGAAATGTATTATGAAAGCCTAATAACTAAATAAAAAATTTAACATTAATAAACT  
 -771 *DOF* *DOF* *DOF* *DOF*  
 AAATTAACAAAAAATTTGTTAAAGAAAAAAGAAAGAAAGAAAAAATTTCTCAAAAGGCATAA  
 -697 *DOF*  
 AAAAAATGTTGTTTAACAGGGATAGTGTTTTATTGTAGAGTGCACAGTGCAGTTCACAGTAAACATTGATCG  
 -623 *ACGTATERD1* *WboxERF3*  
 TCCTTATGCAACGTCAGTCATTTCCAATTAACATTTATTAATAGGGGTTTCTACATGAACAAATCTAAGTTGG  
 -549 *ABRERATCAL* *LTRECORE* *LECPLEACS2* *W-box* *ACGTATERD1*  
 GTATCATGCAACCGCTTCTAAGTGCGGTGCGACTTGCACTCAATATAAATATAAGGAATTGTCAAACAGTGAT  
 -475 *WboxERF3* *WboxERF3*  
 ATGATGACCTTAGGAAGGAAGAATCGTAGTAGTGGCTCACCATCAATGACCGGATGTAATCCTGCTCACCAGT  
 -401 *ABRERATCAL*  
 TTGCTCAAACCGGTGTCACGCTAACGCATCATTACCAACGCTAAACTCTCACCTTCTATTCTACTCTTATTACATG  
 -327 *DPBF-core* *W-box*  
 TCTACCACACGCTCTAAAGCTCCTTAGCCCAACAGTGTGAGGGCATAATTGCCCTCAAGCAAAGACGTCAGT  
 -253 *TATA box* *ACGTATERD1*  
 GCTTACTCGGTAGTACCAGCTCCTTCCAACTTATAAATATAAACTCACAGTCCCTAACTTCCATCCAAACCAT  
 -179 *ACGTATERD1*  
 CAAATATTCAACCACCTTCTTCTTTCCAAGCTTTATACTTTGCTGTTCTTGCTCATCGTATAAACACAAATCAT  
 -105  
 -31 ACTATATATCTAACCTGTAAGCTTAATTACCATG

**Figure 26 : Séquence nucléotidique de la région 5' contenant le promoteur et certaines des boîtes de réponse potentielles du gène *PtaZFP2*.** La région surlignée en gris correspond à la région présentant une forte homologie avec la séquence régulatrice du gène homologue du génome de *Populus trichocarpa*. Les motifs présentant une homologie avec des éléments cis-régulateurs connus sont soulignés et leurs noms sont écrits en gras et en italique lorsqu'il est position sens ou anti-sens respectivement. Les séquences consensus MYC (liaison avec des facteurs de transcription de type MYC) sont encadrées et celles représentant des boîtes CGCG (liaison aux calmodulines) sont en gras. Les chiffres font référence à la position par rapport au codon ATG (+1). Parmi les éléments cis-régulateurs, on retiendra les W-box (boîte de réponse à la blessure), les GARE (boîtes de réponse aux gibbérellines), les ABRE (boîtes de réponses à l'acide abscissique et la déshydratation), les ABRERATCAL (boîte de réponse au calcium) contenant une séquence CGCG de liaison aux calmodulines (d'après Martin *et al.*, 2009).

## *G. Objectifs de la thèse*

Nous l'avons vu, la mécanoperception est essentielle au cours de la vie d'une plante pour adapter sa stature au cours de sa croissance d'une part, et pour faire face aux sollicitations mécaniques externes telles que le vent d'autre part (Moulia *et al.*, 2006). Par ailleurs, comme le montre la désensibilisation des plantes à des flexions répétées, cette mécanoperception semble être finement contrôlée et régulée par la plante (Martin *et al.*, 2010).

Afin de mieux comprendre la régulation de la mécanoperception chez les plantes, il est nécessaire de définir clairement les acteurs moléculaires impliqués dans ce phénomène. Au début de ce travail de thèse, aucun « récepteur du signal mécanique » n'avait été identifié chez les plantes. Bien que l'existence de canaux mécanosensibles ait été démontrée, la nature de ces canaux était encore inconnue. De plus, le modèle biomécanique de mécanoperception, proposant que la variable physique perçue par les cellules soit la déformation de la membrane plasmique (Cutand *et al.*, 2009; Moulia *et al.*, on press), a été confirmé au niveau tissulaire, mais reste à démontrer au niveau cellulaire.

Chez le peuplier, le gène *PtaZFP2* est impliqué dans les étapes précoces de cette mécanoperception : (i) il est induit dès 5 minutes après une flexion de la tige, (ii) son expression est corrélée linéairement à l'intensité des déformations appliquées lors de la flexion d'une tige (Cutand *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2009) et (iii) son expression est régulée différemment en réponse à des flexions répétées, reflétant le phénomène d'accommodation évoqué précédemment (Martin *et al.*, 2010). Il est donc à la fois un marqueur moléculaire de la mécanoperception et de sa régulation par la plante.

Comprendre la régulation de ce gène est donc un moyen d'accéder aux acteurs moléculaires intervenant entre la perception du signal mécanique et les étapes précoces de la voie de signalisation de ce signal. *PtaZFP2* code une protéine de type C2H2 et est potentiellement un facteur de transcription. Les facteurs de transcription reconnaissent de petites séquences d'ADN conservées contenues au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles : les éléments *cis* régulateurs. Ces éléments *cis* peuvent être communs à plusieurs



gènes, et ainsi *PtaZFP2* pourrait réguler l'expression de plusieurs dizaines de gènes impliqués dans la réponse thigmomorphogénétique.

Toutefois, comme pour les C2H2-ZFPs identifiées chez d'autres espèces, *PtaZFP2* appartient à une famille multigénique. Or chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs membres de cette famille multigénique sont régulés par un même facteur abiotique. D'autres C2H2-ZFPs du peuplier pourraient donc être impliquées dans la mécanoperception. Inversement, l'expression de *PtaZFP2* n'est pas régulée uniquement par la flexion mais aussi par d'autres stress abiotiques tels que le froid, la blessure et la gravité (Martin *et al.*, 2009). Bien qu'une composante mécanique puisse être identifiée dans ces différents facteurs abiotiques, ce gène pourrait donc être impliqué dans d'autres voies de signalisation que celle du signal mécanique. Des études supplémentaires sur la régulation de ce gène et sur la fonction de la protéine permettraient de mieux comprendre le rôle de cet acteur moléculaire dans la réponse aux sollicitations mécaniques.

Le premier objectif de ma thèse a donc été de mieux caractériser la régulation de l'expression de *PtaZFP2* et des autres membres de la famille des Q-type C2H2-ZFPs chez le peuplier. Pour cela, nous avons réalisé une analyse phylogénétique globale des Q-type C2H2-ZFPs chez les plantes en général et sur le peuplier en particulier. Cette analyse nous a permis de mieux caractériser les motifs protéiques conservés entre ces protéines et leur lien potentiel avec la fonction des protéines et leur localisation cellulaire. Elle a également été combinée avec l'analyse de l'expression des différents membres de la famille des Q-type C2H2 de peuplier en réponse à différents stress biotiques ainsi qu'à la flexion de la tige. Enfin, nous avons testé, sur cultures cellulaires de peuplier, l'effet de plusieurs molécules impliquées dans les étapes précoces de la mécanoperception sur l'expression des deux membres mécanosensibles de la famille des Q-type C2H2 chez le peuplier.

Le deuxième objectif de la thèse était d'identifier, parmi ces molécules, celles qui sont réellement importantes pour la transduction du signal mécanique et de tester le modèle biomécanique de mécanoperception au niveau cellulaire. Dans ce but, nous avons cherché à mettre au point un dispositif permettant d'appliquer une déformation quantifiable sur des cellules. Enfin, lorsqu'on s'intéresse à la régulation d'un gène, il paraît important d'étudier le promoteur de ce gène. Or, les promoteurs des gènes de la famille des C2H2 ne sont, à notre connaissance, pas étudiés à ce jour et, d'autre part, seul un élément *cis* régulateur



potentiellement impliqué dans le stress mécanique a été identifié *in silico* chez *Arabidopsis thaliana* (Walley *et al.*, 2007). Nous avons donc tenté de définir des régions voire des éléments *cis* régulateurs importants du promoteur de *PtaZFP2* et expliquant sa régulation au cours de la mécanoperception.

Finalement, afin de mieux caractériser la fonction de cette protéine, nous avons produit plusieurs outils moléculaires (protéines de fusion, anticorps) afin de définir (i) sa localisation cellulaire (si c'est un facteur de transcription, se trouve-t-il dans le noyau ?), (ii) sa localisation tissulaire (existe-t-il des tissus mécanosensibles spécifiques ? Quels sont les tissus impliqués dans cette mécanoperception ?) et (iii) sa cinétique d'accumulation en réponse à la sollicitation mécanique (la protéine est-elle stable ?)





*Résultats*



# *Chapitre 1*

*Etude phylogénétique des Q -type C2H2-ZFPs chez les plantes et  
analyse d'expression de gènes de peuplier en réponse aux  
stress osmotique, au froid et à la sollicitation mécanique*



Chez les plantes, les Q-types C2H2-ZFPs sont impliquées dans le développement et la réponse à de nombreux stress biotiques et abiotiques. Dans la plupart des espèces étudiées, les gènes codant ces protéines appartiennent à une famille multigénique. Au sein de ces familles, plusieurs membres peuvent être régulés par un même stress abiotique et la spécificité d'action de chaque membre de ces familles n'est pas encore bien caractérisée (Agarwal *et al.*, 2007; Ciftci-Yilmaz and Mittler, 2008; Kam *et al.*, 2008). Un moyen de mieux appréhender la fonction de ces protéines et leur spécificité est d'étudier leur relation phylogénétique et d'identifier des motifs protéiques caractéristiques. Des études phylogénétiques ont été réalisées sur l'ensemble des C2H2-ZFPs chez *Arabidopsis thaliana* et chez le riz ainsi que sur les Q-type C2H2-ZFPs chez le blé (Englbrecht *et al.*, 2004; Agarwal *et al.*, 2007; Kam *et al.*, 2008). Englbrecht et ses collaborateurs (2004) ont permis de définir différents groupes de C2H2-ZFPs chez *Arabidopsis thaliana* en fonction du nombre, de la disposition et de la structure des ZFs et définir des motifs protéiques conservés. Les motifs protéiques et les différents groupes identifiés chez *Arabidopsis thaliana* ont ensuite été retrouvés parmi les 189 C2H2-ZFPs du riz (Agarwal *et al.*, 2007). Enfin, Kam et ses collaborateurs (2008) ont identifié 47 Q-type C2H2-ZFPs à un ou deux ZF(s) chez le blé (TaZFPs) et présentent les relations phylogénétiques de ces TaZFPs entre elles ou comparativement aux Q-type C2H2-ZFPs de riz et d'*Arabidopsis thaliana*.

Si beaucoup de Q-type C2H2-ZFPs ont été identifiées chez de nombreuses plantes, aucune étude phylogénétique globale incluant toutes les Q-types C2H2-ZFPs de plantes n'a été réalisée depuis 1998 (Kubo *et al.*, 1998). Nous avons réalisé une étude phylogénétique globale des Q-type C2H2-ZFPs à deux ZFs chez les plantes ainsi qu'une recherche de motifs protéiques conservés. Nous avons étudié leurs relations phylogénétiques et recherché si la répartition phylogénétique et/ou la distribution des motifs protéiques pouvaient expliquer l'implication de ces protéines dans la réponse à différents stress abiotiques. Nous nous sommes ensuite intéressés plus particulièrement aux 16 Q-type C2H2-ZFPs à deux ZFs de peuplier et nous avons combiné cette approche bioinformatique à l'étude de l'expression des gènes en réponse à différents stress (stress salin, osmotique, froid, blessure des feuilles) dans différents organes (tiges, racines et feuilles).

Nous avons ensuite testé si les membres de cette famille multigénique étaient impliqués dans la réponse au stress mécanique. Deux membres sont fortement exprimés en



réponse à la flexion contrôlée d'une tige : le gène d'intérêt *PtaZFP2* (Martin *et al.*, 2009) et un deuxième membre, *PtaZFP1*, très proche au niveau phylogénétique. Puisque nous nous intéressons aux étapes précoces de la mécanoperception, nous avons cherché des molécules capables de réguler l'expression de ces deux gènes. En nous référant aux molécules déjà identifiées comme intervenant dans la réponse au stress mécanique (Telewski, 2006; Chehab *et al.*, 2009), nous avons donc étudié l'expression de ces deux gènes en réponse à différents traitements (calcium, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, éthylène, ABA, gibbérellines, jasmonates, cycloheximide) sur des cultures cellulaires de peuplier.

Ces résultats sont présentés sous forme d'une publication soumise et acceptée avec modifications mineures (09/12/2010) dans le journal *DNA research*.





## Phylogenetic Study of Plant Q-type C2H2 Zinc Finger Proteins and Expression Analysis of Poplar Genes in Response to Osmotic, Cold and Mechanical Stresses

DELPHINE Gourcilleau<sup>1,†</sup>, CATHERINE Lenne<sup>1,\*</sup>,†, CLAUDIA Armenise<sup>1</sup>, BRUNO Moulia<sup>2</sup>, JEAN-LOUIS Julien<sup>1</sup>, GISELE Bronner<sup>3,\*</sup>, and NATHALIE Leblanc-Fournier<sup>1,\*</sup>

Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR 547 Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier, 24 avenue des Landais, BP 10448, 63177 Aubière Cedex, France<sup>1</sup>; INRA, UMR 547 Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier, 234 avenue du Brêzet, 63100 Clermont-Ferrand, France<sup>2</sup> and Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR Laboratoire des Microorganismes: Génomique et Environnement, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France<sup>3</sup>

\*To whom correspondence should be addressed. Tel. +33 4 73 40 79 26 (C.L.), +33 4 73 40 78 37 (G.B.), +33 4 73 30 79 30 (N.L.-F.). Fax. +33 4 73 40 79 16 (C.L.), +33 4 73 40 76 70 (G.B.), +33 4 73 40 79 16 (N.L.-F.). Email: catherine.lenne@univ-bpclermont.fr (C.L.), gisele.bronner@univ-bpclermont.fr (G.B.), nathalie.leblanc@univ-bpclermont.fr (N.L.-F.)

Edited by Satoshi Tabata

(Received 28 September 2010; accepted 20 January 2011)

### Abstract

**Plant Q-type C2H2 zinc finger transcription factors play an important role in plant tolerance to various environmental stresses such as drought, cold, osmotic stress, wounding and mechanical loading. To carry out an improved analysis of the specific role of each member of this subfamily in response to mechanical loading in poplar, we identified 16 two-fingered Q-type C2H2-predicted proteins from the poplar Phytozome database and compared their phylogenetic relationships with 152 two-fingered Q-type C2H2 protein sequences belonging to more than 50 species isolated from the NR protein database of NCBI. Phylogenetic analyses of these Q-type C2H2 proteins sequences classified them into two groups G1 and G2, and conserved motif distributions of interest were established. These two groups differed essentially in their signatures at the C-terminus of their two QALGGH DNA-binding domains. Two additional conserved motifs, MALEAL and LVDCHY, were found only in sequences from Group G1 or from Group G2, respectively. Functional significance of these phylogenetic divergences was assessed by studying transcript accumulation of six poplar C2H2 Q-type genes in responses to abiotic stresses; but no group specificity was found in any organ. Further expression analyses focused on *PtaZFP1* and *PtaZFP2*, the two genes strongly induced by mechanical loading in poplars. The results revealed that these two genes were regulated by several signalling molecules including hydrogen peroxide and the phytohormone jasmonate.**

**Key words:** C2H2; phylogenetic analysis; abiotic stress; mechanical loading

### 1. Introduction

Transcription factors play a key role in modulating the acclimation response of plants to various internal

or external cues. A subset of these transcription factors belongs to the zinc finger proteins (ZFPs) characterized by zinc finger domains (ZFs) enabling protein interaction with DNA. The term “zinc finger” refers to a protein motif that binds a zinc ion in order to stabilize its three-dimensional structure consisting of a two-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet and

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this article.



$\alpha$ -helix.<sup>1</sup> ZFPs are classified according to the number and the order of the Cys (cysteine) and His (histidine) residues that bind the zinc ion. Among these different ZFPs types, C2H2-ZFPs are one of the most abundant and often studied transcription factors in eukaryotes.<sup>2</sup> *In silico* analysis has shown that ~3% of all genes in mammals, ~2.3% in *Diptera*, ~0.8% in *Saccharomyces cerevisiae* and ~0.7% in *Arabidopsis thaliana* encode C2H2-ZFPs.<sup>3</sup> In *A. thaliana*, more than 2000 potential transcription factors have been identified,<sup>4,5</sup> of which ~9% belong to the C2H2-ZFP family.

C2H2-ZFPs are characterized by a conserved sequence CX<sub>2-4</sub>CX<sub>3</sub>FX<sub>5</sub>LX<sub>2</sub>HX<sub>3-5</sub>H (where underlined C and H represent Cys and His interacting with the zinc ion). Plant C2H2-ZFPs possess one to five ZFs. Two main features distinguish most of them from other eukaryote C2H2-ZFPs. First, most plant C2H2-ZFPs contain an invariant QALGGH motif inside the ZF, whereas yeast and animals do not. Second, for multiple-fingered C2H2-ZFPs, ZFs are separated by longer spacers than in other eukaryotes.<sup>1,6</sup> Both the QALGGH motif and length of sequences between two successive ZFs are thought to be important for the affinity of the protein to its DNA target.<sup>6-8</sup> C2H2-ZFPs can be divided into three classes according to the number, types and arrangement of ZFs.<sup>3,9</sup> According to an *in silico* genome-wide comparative analysis performed in *A. thaliana*,<sup>3</sup> two classes, A and B, encompass ZFPs that contain tandem ZFs in one or in more than one array, respectively (as proposed earlier for yeast genome). Class C corresponds to ZFPs containing a single ZF or dispersed ZFs (ZFs being considered dispersed when more than 10 amino acid (AA) residues separate two consecutive ZFs). Most C2H2-ZFPs in animals and yeast can be classified in Classes A and B, but plant C2H2-ZFPs are found mainly in Class C. This third class can be divided into three subclasses according to the number of AA residues separating the two invariant His of the ZFs: three, four or five residues for Subclasses C1, C2 and C3, respectively. Inside Subclass C1, 85% of the C2H2 proteins contain strictly the QALGGH motif (or with few modifications),<sup>3</sup> also called Q-type ZFs in rice.<sup>3,10</sup> *In silico* studies on ZFPs have identified 64 Q-type C2H2-ZFPs in *A. thaliana*,<sup>3</sup> 99 in rice (*Oryza sativa*)<sup>10</sup> and 47 in bread wheat (*Triticum aestivum*).<sup>11</sup>

First considered exclusively as transcription factors with sequence-specific binding to DNA, ZFPs are now known to recognize RNA or other proteins.<sup>12</sup> However, their role as transcription factors is still most often studied. In plants, the C2H2 proteins belonging to Class C are the largest family. They are involved in a wide range of processes including development and organogenesis along with response to stress and defence pathways. These proteins have

been shown to be involved in salt stress, cold, dehydration and light stress in *A. thaliana*,<sup>13-16</sup> the switch from vegetative to floral development and drought in rice,<sup>11,17</sup> flower development and drought in *Petunia*,<sup>18,19</sup> pathogen defence in *Capsicum annuum*<sup>20</sup> and water and salt stress in *Thellungiella halophila*.<sup>21</sup> These studies suggest that C2H2-ZFPs may not be specific to one particular stress but may regulate responses to several stresses.

In *Populus tremula* × *alba*, by studying the first molecular stages of the mechanosensing response, we recently identified a C2H2 Q-type gene called *PtaZFP2*. Its expression is induced as fast as 5 min after the bending of a poplar stem.<sup>22</sup> As in other plant species,<sup>6</sup> this gene is also regulated by other stresses such as cold and salt stress.<sup>22</sup> Apart from this *PtaZFP2* gene, little is known about the Q-type C2H2 gene subfamily in poplar (and in woody species more generally) or their specific responses to different abiotic stresses, in particular to mechanical loadings. In this study, we performed a genome-wide identification of Q-type ZFP genes in poplar, using *PtaZFP2* protein sequence as a query in the NR protein and Phytozome databases. In all, 310 sequences were identified, belonging to more than 50 plant species. We then focused on two-fingered Q-type ZFPs encompassing 168 non-redundant sequences from different plant species, including 16 *Populus trichocarpa* sequences. Expression analyses of different members of the poplar Q-type subfamily were performed by designing primers according to the different poplar phylogenetic groups. We determined their mRNA distribution in different organs with or without abiotic stresses. Finally, poplar cell cultures were used to study the effect of calcium, reactive oxygen species (ROS) and phytohormones on the expression of the two genes previously described as showing the strongest response to stem bending.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Identification of C2H2 plant proteins

A BLAST search (blastp with default parameters)<sup>23</sup> against the NR protein database of NCBI and *P. trichocarpa* Phytozome database was performed, using the AA sequence of the *PtaZFP2* gene from *P. tremula* × *P. alba* (GenBank: FM172949.1) as query sequence. All hits below an *E*-value of 10<sup>-4</sup> were retrieved. We found 310 and 26 sequences in NCBI and *P. trichocarpa* Phytozome databases, respectively. These 336 sequences were analysed using the Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation (MEME)<sup>24</sup> program with default settings to detect ZF motifs. Only two-fingered C2H2 sequences were further analysed (243 sequences).

PCR fragment	Length	Annealing temperature	Primers	Sequence
<i>Pta-ZFP1</i>	198 bp	55°C	<i>Pta-ZFP1S</i>	GAT AAT ATT GAT GCT ACC AGT
			<i>Pta-ZFP1AS</i>	CAA CAC AGG TTG AGT GCT GGC
<i>Pta-ZFP2</i>	287 bp	60°C	<i>Pta-ZFP2S</i>	CGT GCG AGT CAC AAG AAA CC
			<i>Pta-ZFP2AS</i>	CAC AGA ACT CTC TTG CTG CT
<i>Pta-ZFP3</i>	216 bp	60°C	<i>Pta-ZFP3S</i>	GAT GAC ATA ACC ATG GCT AAT
			<i>Pta-ZFP3AS</i>	TGG CGA TTG AGT CTC GAA GCT
<i>Pta-ZFP4</i>	171 bp	60°C	<i>Pta-ZFP4S</i>	CCT TTC AAT TAC GAA GAC ACA TGT
			<i>Pta-ZFP4AS</i>	CGG TGC TGG GGA GGC GGT TTC TTT
<i>Pta-ZFP5</i>	282 bp	55°C	<i>Pta-ZFP5S</i>	CCT TTA AAT TAT GAA GAA ACA TGG
			<i>Pta-ZFP5AS</i>	GA CTC GGA GGA GGA TTT CCT
<i>Pta-ZFP6</i>	192 bp	60°C	<i>Pta-ZFP6S</i>	GGC GAA GAC CAA ACT ACT TCC
			<i>Pta-ZFP6AS</i>	AGT GAC ACC ACT CTT TTC GCC
<i>Ubg</i>	146 bp	60°C	UBC146A	CCC GGC TCT AAC CAT ATC CA
			UBC146B	GGG TCC AGC TTC TTG CAG TC
<i>EF1<math>\alpha</math></i>	378 bp	60°C	EF1S	GAC AAC TAG GTA CTA CTG CAC TGT C
			EF1AS	TTG GTG GAC CTC TCG ATC ATG

**Supplementary data 1: Characteristics of primers used for expression analyses.**

## 2.2. Sequence alignment and phylogenetic analysis

Protein sequences were aligned using MUSCLE.<sup>25</sup> Identical and incomplete sequences were excluded from the alignment. The final alignment was composed of 168 sequences. Due to the high variability of sequences and length of spacers between the two ZFs, phylogeny was carried out only on the ZF motifs. The phylogenetic tree of 100 bootstrapped samples was constructed using the maximum likelihood (ML) method implemented PhyML<sup>26</sup> using the GTR + I + G model, chosen after using the program ProtTest<sup>27</sup> on the sequence set.

## 2.3. Identification of conserved two-fingered C2H2 plant protein-associated motifs

The program MEME<sup>24</sup> was used with default settings, except for the maximum number of motifs to find, which was set to 15, to detect potential conserved motifs including the known ZF motifs.

## 2.4. Plant material and culture conditions

Young poplars (*P. tremula* × *P. alba* INRA clone 717-1B4) were obtained by *in vitro* micropropagation and grown on nutrient solution<sup>28</sup> after acclimation (for more details, see Martin *et al.*<sup>22</sup>). Trees were grown in a growth chamber (16 h/8 h light/dark at 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at 24°C/20°C with relative humidity of 60 ± 10%). Two months after micropropagation, the poplars were ready to be used in experiments; stems were about 35 cm tall at this stage. The tested stems ranged in diameter from 4.3 to 6.3 mm, with an average of 5.18 ± 0.51 mm.

## 2.5. Cell culture conditions

Poplar suspension cells were initiated by transferring 2–3 g of fresh callus to 20 ml of liquid MB5 medium containing 2 mg ml<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.2 g l<sup>-1</sup> L-glutamine and 1 mg l<sup>-1</sup> vitamins (nicotinic acid, pyridoxine hydrochloride and thiamine hydrochloride). Cell cultures were maintained in the dark at 120 rpm on a gyratory shaker in a culture room at 23°C for at least 8 days. Cell cultures were then maintained in the same environmental conditions by putting 10 ml into 40 ml of fresh MB5 medium each week containing 2 mg ml<sup>-1</sup> 2,4-D, 0.2 g l<sup>-1</sup> L-glutamine and 1 mg l<sup>-1</sup> vitamins (nicotinic acid, pyridoxine hydrochloride and thiamine hydrochloride).

## 2.6. Plant treatments

Plants were subjected to salt, osmotic, cold, wounding, or bending stresses, or were unstressed (controls). Salt stress was applied by adding NaCl to the hydroponic solution to a final concentration of 50, 100 or 200 mM. Osmotic stress was applied by adding

polyethylene glycol (PEG) to the hydroponic solution to a final concentration of 20% (w/v). In cold treatment, plants were left at 4°C for 1 h. Plants were wounded by crushing their laminae (leaves without the petiole and central vein) with a pestle. Sampling was carried out 1 h after the treatments. Finally, stem bending was performed by rolling stems on a plastic tube according to Martin *et al.*<sup>29</sup> taking care that the applied mechanical loading was the same for all stems. The bent portion (3 cm long) was collected 0, 10, 15, 30 min, 1, 3, 5 or 24 h after bending. Samples were quickly frozen in liquid nitrogen after sampling and stored at -80°C until analysis.

## 2.7. Cell treatments

Aliquots of 5 ml of 4-day-old cell cultures were placed in 15 ml sterile tubes and left with stirring at 120 rpm in the dark at 23°C for 2 h to prevent aliquoting stress. The culture cells were then treated with calcium 10 mM (CaCl<sub>2</sub>), hydrogen peroxide 500  $\mu\text{M}$  (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), abscisic acid 100  $\mu\text{M}$  (ABA), ethephon 1 mM (Ete), gibberellic acid 100  $\mu\text{M}$  (GA), methyljasmonate 100  $\mu\text{M}$  (MeJA) or cycloheximide 50  $\mu\text{M}$  (Chx). Stirring, darkness and temperature were maintained throughout the experiment. After different times, the medium was removed and cells were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysed.

## 2.8. RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted from 5 ml of culture cells using CTAB extraction buffer as described by Chang *et al.*<sup>30</sup> and then treated with RNase-free RQ1 DNase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). RNA was quantified spectrophotometrically and checked by agarose gel electrophoresis. First-strand cDNA was synthesized from 1  $\mu\text{g}$  total RNAs using oligodT and SuperScript III (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) following the supplier's protocol.

## 2.9. RT-PCR analysis

RT-PCR analyses were performed on 4  $\mu\text{l}$  of 1:40 dilution of the first-strand cDNA. After a heat step at 95°C for 5 min, PCR cycling conditions were: denaturation (95°C, 30 s), annealing (temperature according to primers, Supplementary data 1, 30 s) and elongation (72°C, 45 s), ending with a final elongation step at 72°C for 5 min. Transcripts of each studied gene and of reference genes *EF-1 $\alpha$*  (Elongation Factor-1 $\alpha$ ) and ubiquitin (*Ubq*) were amplified using the primers described in Supplementary data 1. The PCR products were separated on a 2% agarose gel.





### 2.1.0. Real-time quantitative RT–PCR experiments

The real-time quantitative RT–PCR amplifications were performed using an iCycler IQ (Bio-Rad) with SYBR green as a fluorescent dye. Each PCR reaction (25 µl) contained the following: cDNA (4 µl of 1:40 dilution of the first cDNA strands), MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay w/ fluorescein (Eurogentec, Angers, France) (1×) and primers (200 nM of each). After a heat step at 94°C for 3 min, PCR cycling conditions were 40 cycles of denaturation (94°C, 15 s), annealing (temperature according to primers, Supplementary Table S1, 15 s) and elongation (72°C, 20 s), ending with a final elongation step at 72°C for 5 min. Transcripts of each studied gene and of reference gene *EF-1α* were amplified using the primers described in Supplementary data 1.

Relative quantitative abundance (Qr) of each gene transcripts was calculated by comparison with the expression of *EF-1α* using the delta–delta method mathematical model.<sup>31</sup>

$$Qr = \frac{2^{(C_{\text{control}} - C_{\text{treated}})_{\text{targetgene}}}}{2^{(C_{\text{control}} - C_{\text{treated}})_{\text{referencegene}}}}$$

where C is the threshold cycle number of PCR. The specificity of amplification was confirmed by determining the melt curves for the PCR products at the end of each run and by gel electrophoresis. The real-time PCR amplifications were performed in at least two independent experiments, and each run was carried out in triplicate. Statistically different groups were obtained with a Tukey's honestly significantly different (HSD) test.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Identification of Q-type C2H2-ZFPs in

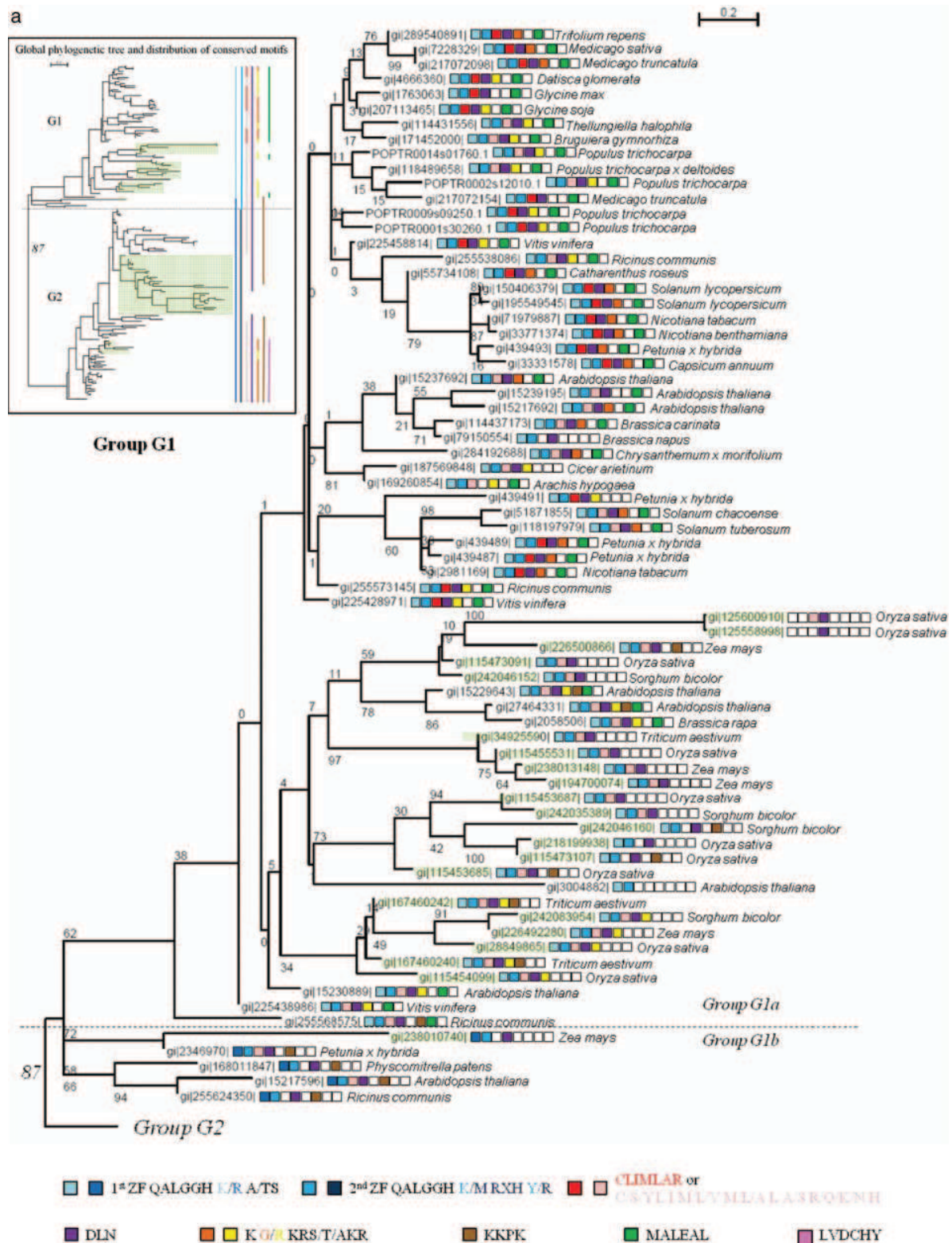
*P. trichocarpa* and their phylogenetic relationships with Q-type C2H2-ZFPs of other plant species

The mechanosensitive *PtaZFP2* gene isolated in *P. tremula* × *P. alba* encodes a C2H2-ZFP with two Q-type ZFs, i.e. containing an invariant plant QALGGH motif.<sup>22</sup> To gain a better understanding of the putative function of this gene subfamily in poplar in response to mechanical loading, the *PtaZFP2* protein sequence was used for BLAST searches against the NR protein and *P. trichocarpa* Phytozome databases. The search with the NR protein database resulted in a total of 310 Q-type C2H2-ZFPs sequences belonging to more than 50 species (data not shown). A first search with the MEME program on these sequences enabled us to determine Q-type ZF domains and manually to distinguish 16 sequences with only one ZF, 226 with two ZFs, 53 with three ZFs, 13 with four ZFs and two sequences with five ZFs. The same was done with the

*P. trichocarpa* Phytozome database and 26 C2H2-ZFPs sequences from *P. trichocarpa* genome were identified. Among these sequences, 16 contained two ZFs, 6 had three ZFs, 3 had four ZFs and 1 had five ZFs. No one-fingered ZFPs were identified in poplar with our method. However, when only one ZF motif was used for supplementary BLAST analysis against the *P. trichocarpa* Phytozome database, five poplar ZFPs with one QALGGH finger were detected. Because they are known to be implicated in abiotic stress responses,<sup>6</sup> in this study we focused the phylogenetic analysis on two-fingered sequences, corresponding to the C1-2i subclass of ZFPs described in *A. thaliana*.<sup>3</sup> AA sequence alignment enabled us to discriminate redundant sequences, and the final tree was constructed with 168 sequences (152 from NCBI and 16 from *P. trichocarpa* Phytozome database). Among the 16 *P. trichocarpa* sequences, the POPTR-1833s00200 is a very short sequence (partial EST), corresponding to a predictive peptide sequence of only 77 AA, whereas the other Q-type ZFP protein contains between 193 AA and 318 AA. In the case of POPTR-0008s03220, the N-terminus part of the predictive sequence seems shorter than would be expected for a complete sequence. Analysis of the *P. trichocarpa* genome<sup>32</sup> revealed that 15 of these sequences could be localized on nine different chromosomes (1,2,4,6,8,9,10,14,16) out of the 19 chromosomes of the poplar genome. Examination in the *P. trichocarpa* genome browser showed that in the same chromosome, these Q-type C2H2 genes are not particularly close to each other. To illustrate phylogenetic relationships between these sequences, the ML tree (unrooted) was constructed (Supplementary data 2) using PhyML.<sup>26</sup> Bootstrap values from 100 replicates were used to indicate the robustness of the result. This analysis clearly identified two major groups with a strong bootstrap value of 87: Group G1 and Group G2 (Fig. 1a and b, respectively). Sequences from monocots and eudicots were found in both, but in each group, the monocot sequences were grouped. This finding suggests that the separation of these two groups was ancestral to the monocot/eudicot separation. Within each group, the bootstrap values are weak. As most C2H2-ZFPs share little homology with highly variable spacer length outside the conserved C2H2-ZFs, the phylogeny was performed on their C2H2-ZFs domains, justifying these lower bootstrap values. Interestingly, some motifs other than the ZF motifs were strictly associated with a group (e.g. MALEAL with Group G1 and LVDCHY with Group G2). These data reinforce the phylogenetic separation of the two groups and may reveal different functions between the corresponding proteins. An ML tree was also constructed with the 16 *P. trichocarpa* sequences (Fig. 2a). Here again two major independent groups







**Figure 1.** Phylogenetic study of two-fingered Q-type C2H2-ZFPs in plants using NCBI and poplar Phytozome blast against the PtaZFP2 AAs sequence. The global phylogenetic tree is shown in insets. The distribution of conserved AAs motifs is symbolized with coloured lines. (a and b) Detail of Group G1 and Group G2 of the global phylogenetic tree. The poplar sequences begin with POPTR. The monocot sequences are framed in light green. Presence of motifs described in (c) is symbolized with coloured squares just after the sequence name; white squares symbolize absence of motif. (c) Consensus sequences of conserved motifs among two-fingered Q-type C2H2-ZFPs in plants and associated colours for motif symbolization.



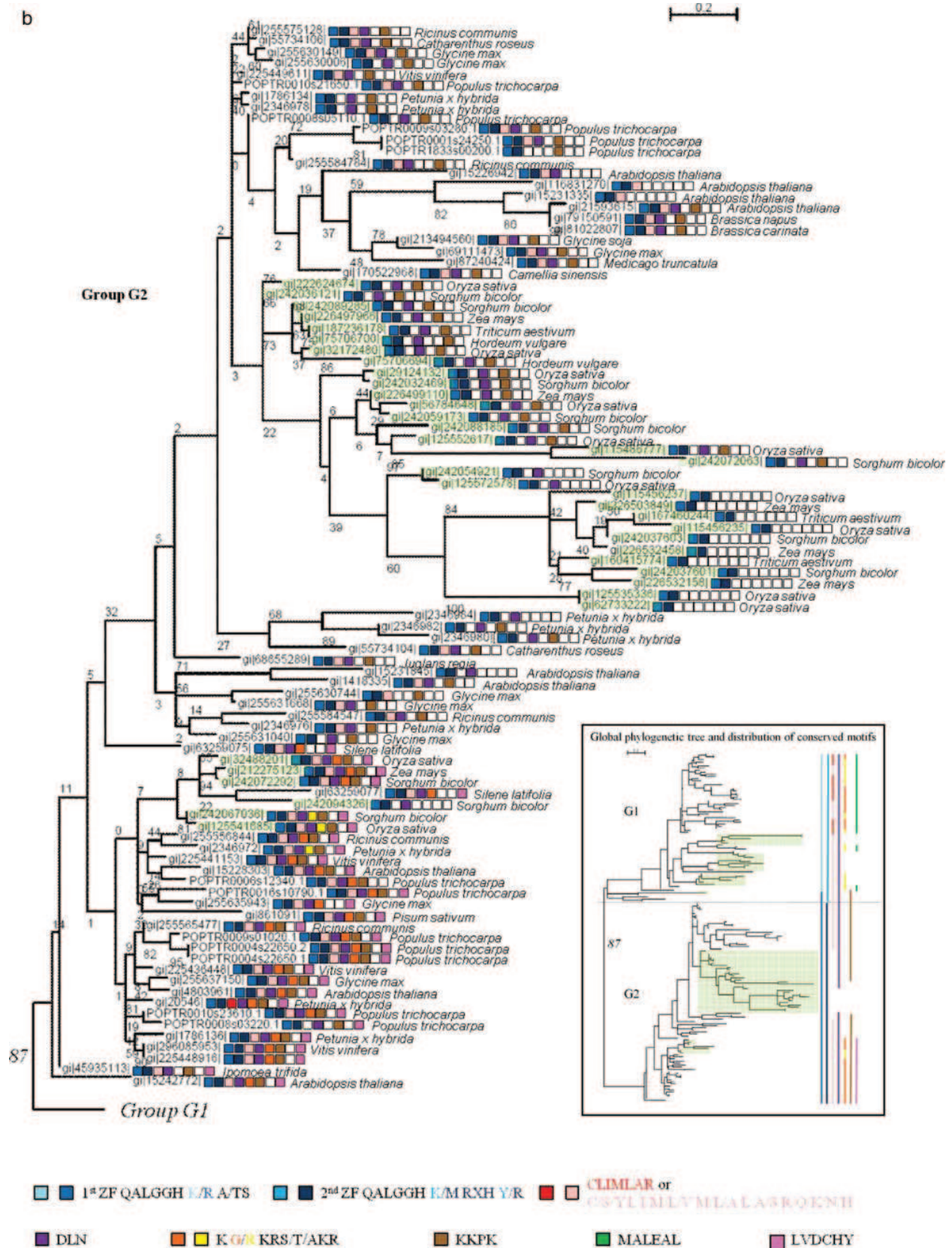


Figure 1. (Continued)





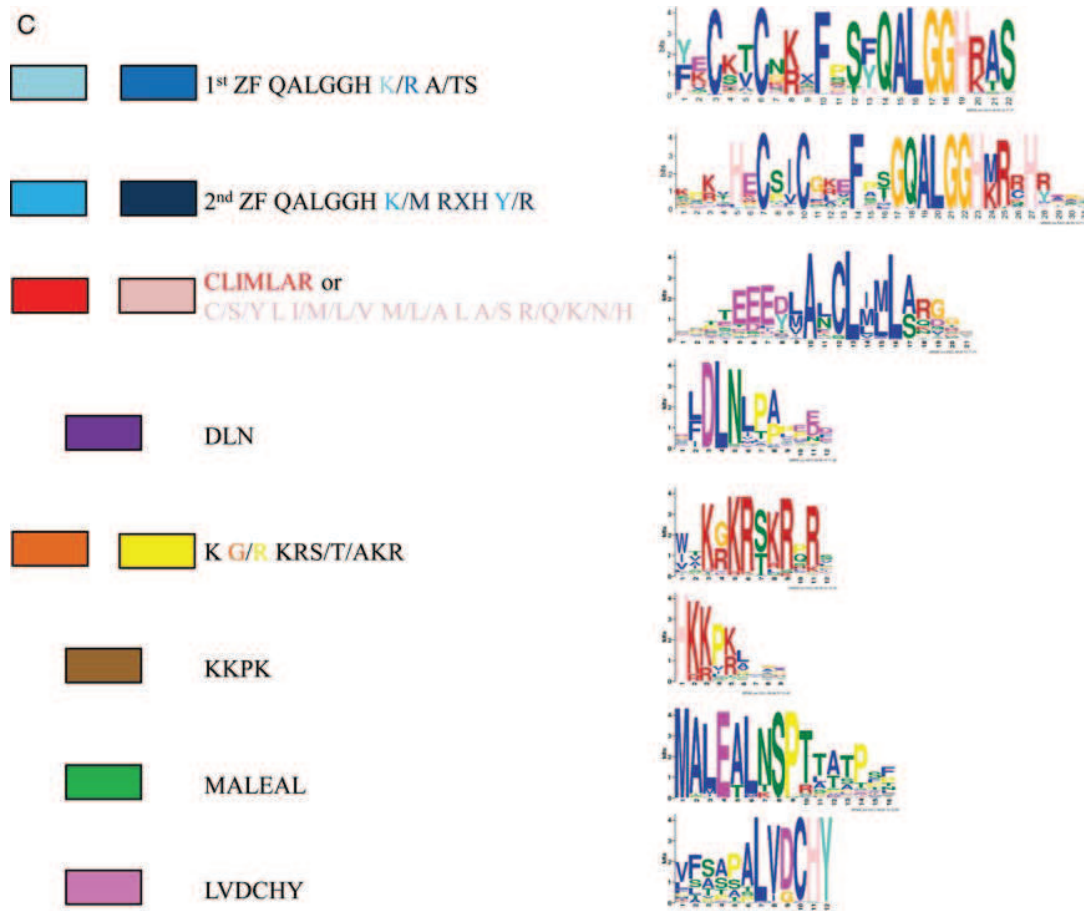


Figure 1. (Continued)

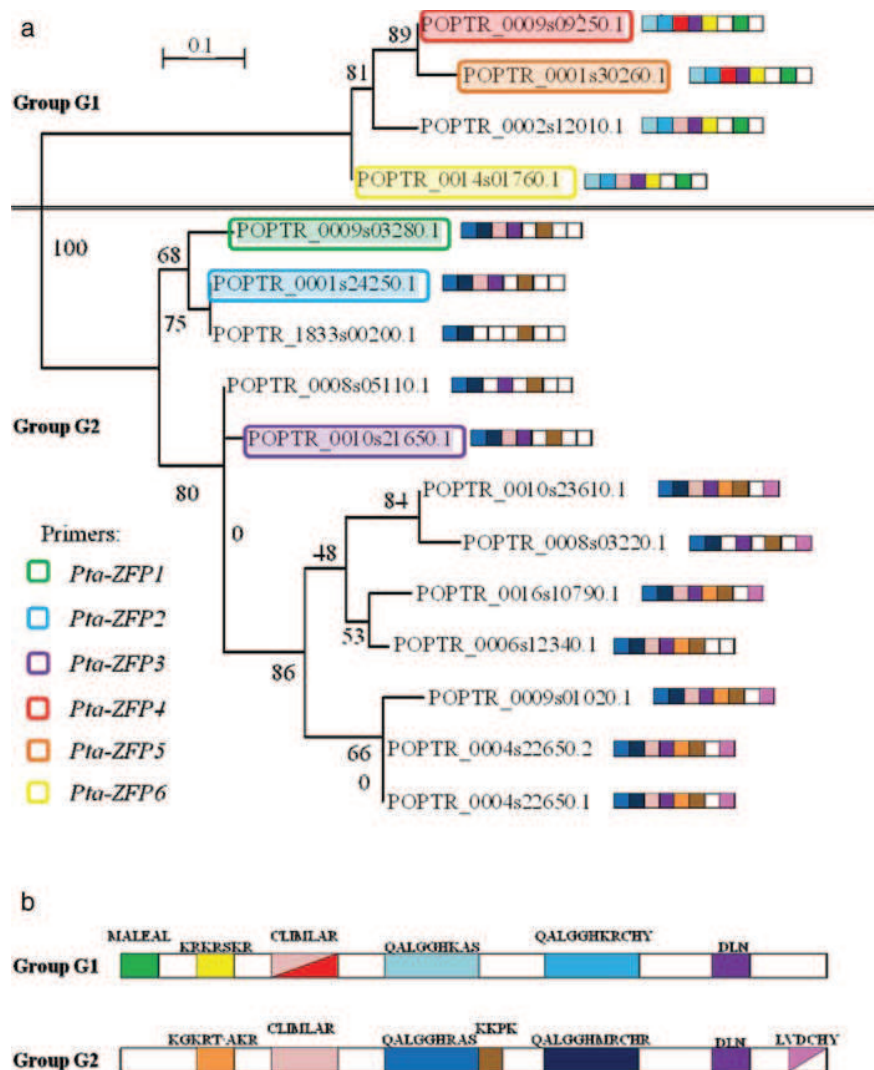
were strongly differentiated, with a bootstrap value of 100, and a different distribution of conserved motifs could be observed between the two groups (Fig. 2b). Group G1 comprised four of these poplar sequences (POPTR\_0009s09250, POPTR\_0001s30260, POPTR\_0002s12010 and POPTR\_0014s01760). Inside Group G2, POPTR\_0001s24250 corresponded to the *P. trichocarpa* orthologous gene of *P. tremula* × *P. alba* mechanosensitive gene *PtaZFP2*. When we compared these phylogenetic relationships with the classification proposed for the *A. thaliana* C1-2i subclasses,<sup>3</sup> Group G1 comprised STZ/ZAT10 (gi.15217692),<sup>33</sup> ZAT6 (gi.15237692)<sup>34</sup> and AZF3 (gi.15239195)<sup>33</sup> genes of *A. thaliana*, previously grouped in the C1-2iD subclass by Engbrecht *et al.*<sup>3</sup> In our study, the other *A. thaliana* subclasses (C1-2iB and C1-2iC) were found in Group G2. The *P. trichocarpa* sequences POPTR\_0009s03280, POPTR\_0001s24250, POPTR\_1833s00200, POPTR\_0008s05110 and POPTR\_0010s21650 had closest similarity with ZAT7 (gi.15231335), ZAT12 (gi.21593615) and At2g28710 (gi.15226942) *A. thaliana* genes (C1-

2iB subclass), whereas the other poplar sequences of group G2 shared similarity with ZAT 5 (gi.15242772) and At3g10470 (gi.15228303) genes of *A. thaliana* (subclass C1-2iC). No poplar sequence corresponding to the *A. thaliana* C1-2iA (including the ZAT11 gene-gi.1418335) was found in this analysis.

### 3.2. C2H2 zinc finger domains and other conserved motifs

For a better analysis of these phylogenetic relationships, we searched all the sequences for conserved motifs. Eight motifs including the ZFs were identified using the MEME algorithm and MUSCLE multiple sequence alignments (Fig. 1c). For each sequence of the tree, we manually annotated the absence or presence of each motif (Figs 1a, b and 2; Supplementary data 1). Interestingly, in each protein, the first and second ZF differed in their sequences and in particular by AAs localized in the C-terminus of the conserved QALGGH motif. The first ZF was characterized by a QALGGH R/K A/T S motif, whereas the second was characterized by QALGGH M/K RXH R/Y. These





**Figure 2.** (a) Phylogenetic tree of the poplar two-fingered Q-type C2H2-ZFPs gene family using poplar Phytozome blast against the PtaZFP2 AA sequence and corresponding primers used for expression analyses. Presence of motifs described in Fig. 1c is symbolized with a coloured square just after the sequence name; white squares symbolize absence of motif. (b) Distribution of conserved motifs along the poplar sequences.

different signatures in the two ZFs had already been detected in *A. thaliana* and *Petunia* genomes. The first ZF was called Q2-2 or type A ZF for *A. thaliana* and *Petunia*, respectively, and the second ZF was called Q2-3 or type B.<sup>3,8</sup> Also, the signatures in the different ZFs varied appreciably between the two phylogenetic groups G1 and G2. In Group G1, the first ZF was QALGGHKA/TS, whereas in Group G2, it was QALGGHRA/TS. For the second ZF, the signature was QALGGHKRXHY in Group G1, but corresponded to QALGGHMRXHR in Group G2. Inside Group G1, five sequences out of the 72 sequences possess the first ZF of Group G2. These several proteins possessed a “mixed” signature forming a monophyletic group distinct from the other Group G1 proteins. Thus two

subgroups, G1a and G1b, could be defined (Fig. 1a). For poplar sequences, the discrimination between the first and second ZF and between Group G1 and Group G2 was strict (Fig. 2a). In *Petunia*, *in vitro* binding analysis revealed that the conserved QALGGH motif played a critical role in DNA binding activity.<sup>7</sup> Other work showed that the flanking residues at the C-terminus of QALGGH motif were important for the specific DNA recognition.<sup>8</sup> Also, the optimal binding sites of the *Petunia* ZPT2-2 protein corresponded to the AGC(T) sequence for the first ZF and to the CAGT core for the second ZF,<sup>35</sup> confirming the role of the residues flanking the QALGGH motif in the specificity of the DNA target-sequence recognition and in DNA binding. The function of the



KG/RKRS/TKR										
POPTR_001610790.1	-----	---MGSQAM	VSKELSQI <b>IK</b>	<b>GR</b>	<b>AKR</b>	RDRPS	SPLTLAITCS	SASVGE--NG	GERGQRIYNN SSSSDPSTSV KFTGRTDEEE	
POPTR_001023610.1	-----	-----MEA	SEEVAANV <b>VK</b>	<b>GR</b>	<b>TKR</b>	LRVQ	SPIPYGLTAN	SSSGDG----	-----G TWSPTSSIN EFQDSTEEEE	
POPTR_000803220.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----P FKRFPKTTTT SSSSRSDHDH	
POPTR_000901020.1	-----	---M	MDMEAQDEFM	GSNDLTQIV <b>K</b>	<b>GR</b>	<b>TKR</b>	QRSS	SPHKVATSCS	SSGYG--GG GERGVLEEY GSISSTPTSS EVCESTEEEE	
POPTR_000422650.1	-----	---MEAQDDFV	GSNDLTQII <b>K</b>	<b>GR</b>	<b>TKR</b>	QRSS	SPYVMVTSSS	SSGYGGDG	GERGVLEEY GSISSTPTSS EVTERTEEEE	
POPTR_000422650.2	-----	---MEAQDDFV	GSNDLTQII <b>K</b>	<b>GR</b>	<b>TKR</b>	QRSS	SPYMH----	-----	-----GSISSTPTSS EVTERTEEEE	
POPTR_000612340.1	-----	---MGSQDQTM	RSKELKQII <b>K</b>	<b>GR</b>	<b>TKR</b>	PKPS	LPLTLAMTSS	SSSSAGESEG	ELDQRIYNN SSSSPGPSTSF EFMERTGEEE	
POPTR_000903280.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MSSIT MKRGREEGEL	
POPTR_000124250.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MKRDREQAEI	
POPTR_183300200.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
POPTR_000805110.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
POPTR_001021650.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MKR GLHEREIDSI	
POPTR_000909250.1	-----	-----	-----	-----	MALEAL	NSP	TTATP----	-----FNYEDT	<b>CV</b> <b>KR</b> <b>KR</b> <b>SK</b> <b>RS</b> RSESPSTEEE	
POPTR_000130260.1	DRPPPLSLSL	SIPFFLSLEI	LFVCSSRCPL	TQENSVSRIQ	IMALE	ALNS	PT-----	TAAPFNYEET	<b>W</b> <b>KR</b> <b>KR</b> <b>SK</b> <b>RS</b> RSESPSTEEE	
POPTR_000212010.1	-----	-----	-----	-----	MALEAL	NSP	TTATPSFQFE	ESSTHCVVEP	<b>W</b> <b>KR</b> <b>KR</b> <b>SK</b> <b>RS</b> RLDHQPTEEE	
POPTR_001401760.1	-----	-----	-----	-----	MALEAL	NSP	TTAPPSFQFE	DLSLPCAGEP	<b>W</b> <b>KR</b> <b>KR</b> <b>SK</b> <b>RS</b> RLDHQPTEEE	
CLIMLAR			MALEAL			KG/RKRS/TKR			KKPK	
POPTR_001610790.1	DMAN <b>CL</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>A</b>	QGN-----	-----	--RQNFKLSK	PVTAAATTIT	YTNKDAGL-Y	AYECKICNRR	FPSF <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>T</b>	
POPTR_001023610.1	DMAN <b>CL</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>A</b>	KGHSRDFFTQ	QQHRHQDYDS	RGGADTTKFN	SRKFLETANS	TGSGKVG-Y	VYECKTCNRT	FPSF <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>T</b>	
POPTR_000803220.1	D-----	S	RGG-----	---VYTAKFN	SRKFLETANS	TGSGRVGY-Y	VYECKTCSRT	FPSF <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>I</b>	
POPTR_000901020.1	DMAN <b>CL</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>A</b>	QGDVPPKQIH	ENK-----	--GSKVEKFS	ARKFSDMSAP	TINK-AGF-F	VYECKTCNRC	FPSF <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>T</b>	
POPTR_000422650.1	DMAN <b>CL</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>A</b>	QGD-RPKQIH	ENK-----	--SGKVEKFR	ARKSSDMSTP	TINK-AGF-L	VYECKTCNRS	FPSF <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>T</b>	
POPTR_000422650.2	DMAN <b>CL</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>A</b>	QGD-RPKQIH	ENK-----	--SGKVEKFR	ARKSSDMSTP	TINK-AGF-L	VYECKTCNRS	FPSF <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>T</b>	
POPTR_000612340.1	DMAN <b>CL</b> <b>I</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>A</b>	QGNQNYK---	-----	----ILVKL	VAIATSTTTT	NINKDAGL-Y	VYQCKTCDRR	FPSF <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>P</b> <b>G</b>	
POPTR_000903280.1	DMAN <b>CL</b> <b>M</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>L</b>	KVG-----	-----	----KAD	DHELPTNYKS	SSPSGAG--R	LFSCKTCNKN	FSS <b>F</b> <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>V</b>	
POPTR_000124250.1	DLAK <b>CL</b> <b>M</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>S</b>	KVQADHE--	-----	----ILTNY	RSAAAAA	TAGAGAGAGR	SFSCKTCNKN	FPSF <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>K</b>	
POPTR_183300200.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----R	SFSCKTCNKN	FPSF <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>K</b>
POPTR_000805110.1	-MAN <b>CL</b> <b>V</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>S</b>	KGR-----	-----	-----E	SYSFSPFDHA	INNNSPS--R	VFECKTCNRK	FPSF <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>M</b>	
POPTR_001021650.1	TMAN <b>CL</b> <b>M</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>S</b>	KGR-----	-----	-----E	SYSFSPFDHA	MSNISPA--R	VFECKTCNRQ	FPSF <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>M</b>	
POPTR_000909250.1	YLAL <b>CL</b> <b>L</b> <b>I</b> <b>M</b> <b>L</b> <b>A</b>	RGG-----	-----	----STTST	TANKETAPP	APPQPPTLNL	SYKCTVCNKA	FPSY <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>K</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>K</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>E</b>	
POPTR_000130260.1	YLAL <b>CL</b> <b>I</b> <b>M</b> <b>L</b> <b>A</b>	RGG-----	-----	-----SP	APPQPPTLDL	SYKCTVCNKA	FSSY <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>K</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>K</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>E</b>		
POPTR_000212010.1	YLAL <b>CL</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>L</b> <b>A</b>	RGSTNLP---	-----	----IPALD	GHHKKSAPP	TASTSSEQKI	SYKCSVCNKE	FPSY <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>K</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b>	
POPTR_001401760.1	YLAL <b>CL</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>L</b> <b>A</b>	RGH-----	-----	----QKSLTPS	TVFTSSELKN	SYKCSVCNKE	FPSY <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>H</b>	<b>K</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b>		
1st ZF QALGGH/RATS										
POPTR_001610790.1	NISEDKKALA	VTVRMGDQEE	NGNDNDMSTA	LSLQIVNDGV	LCSNNVK-SN	KVHECSICGD	EFSS <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>M</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>F</b> <b>A</b> <b>P</b>	----TTTAT	
POPTR_001023610.1	HNDERKKNLS	PSSDEELDGH	YKNVSSLCTF	-----	---SNHNKG	KIHECSVCGA	EFTS <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>M</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>L</b>	---SSTTTLS	
POPTR_000803220.1	HNDERKKQNL	ISS-DEEDGH	YKNVSSLSLQ	---LSENNTN	RGTYSNHNKG	KIHECSVCGA	VFTS <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>M</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>V</b>	---SSTTTLS	
POPTR_000901020.1	APEEKGLVV	ASMEDLDRQ	LNKRSPY-PC	LSLQIPNNNN	VNKGFGANKA	KIHECSICGS	EFMS <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>M</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>T</b> <b>G</b>	ANQVSNISTD	
POPTR_000422650.1	A-EEEKGLVV	ASMEDLGVCQ	LIKRSNLDPS	LSLQIGHNNN	VNKGFGANKA	KIHECSICGS	EFMS <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>M</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>T</b> <b>G</b>	-NQAGMITTD	
POPTR_000422650.2	A-EEEKGLVV	ASMEDLGVCQ	LIKRSNLDPS	LSLQIGHNNN	VNKGFGANKA	KIHECSICGS	EFMS <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>M</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>T</b> <b>G</b>	-NQAGMITTD	
POPTR_000612340.1	SLDHEDKKVL	TTVRMAHEEV	LC---SPNVK	-----	---SN	KVHECSICGA	EFSS <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>M</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>F</b> <b>A</b> <b>A</b>	---ATSTTT	
POPTR_000903280.1	G-----	-----STGN	LLMKLPNSPP	-----	---KP	KNHQCSICGL	EFPI <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>M</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>N</b> <b>I</b>	---DATSNSA	
POPTR_000124250.1	E-----	-----STGN	LL-KLPNSPS	-----	---KP	KTHQCSICGL	EFPL <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>M</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>P</b> <b>H</b> <b>N</b>	VDTTSTSSKD	
POPTR_183300200.1	E-----	-----STGN	LL-KLPNSPS	-----	---KP	KTHQCSICGL	EFPL <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>M</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>P</b> <b>N</b> <b>N</b>	-----	
POPTR_000805110.1	G-----	-----GEGS	FE---SQSPA	-----	---KP	KIHECSICGL	EFAI <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>M</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>N</b>	-----DQNQL	
POPTR_001021650.1	G-----	-----GEGS	FE---TQSPA	-----	---KP	KIHECSICGL	EFAI <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>M</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>N</b>	-----DRNQ	
POPTR_000909250.1	S-----	-----TTAA	ENPSTSTTTP	-----	---TTTTNTSG	RTHECSICHK	TFPT <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>C</b> <b>H</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>I</b>	-GGNNNSSTS	
POPTR_000130260.1	S-----	---TV	ATAAENPSTS	TTTTNTTTTT	-----	---NG	RTHECSICHK	TFLT <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>C</b> <b>H</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>I</b>	-GGNNSSSAS
POPTR_000212010.1	G-----	---EDQTTSC	TTTSATTTPV	-----	---SNGSG	RVHECSICHR	TFPT <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>C</b> <b>H</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>I</b>	GGAEKSGVTS	
POPTR_001401760.1	GEDQ-----	-TTSSTTTSA	ITATKTVSNG	-----	---SG	KIHECSICHK	TFPT <b>Q</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>G</b>	<b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>C</b> <b>H</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>I</b>	GGGEKSGVTS	
DLN			2nd ZF QALGGH/MRXHY/R			LVDCHY				
POPTR_001610790.1	ATTLTSRSLE	RSKPDHESEE	SKKPRDIQLL	<b>DLN</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>A</b>	----AEDD---	-----LR	ESKFHFASKE	QVLVFTASS	<b>L</b> <b>V</b> <b>D</b> <b>C</b> <b>H</b> <b>Y</b>	
POPTR_001023610.1	LTPLAIESEE	PKKARNALS-	-----LDL	<b>DLN</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>A</b>	----PDDE--K	FAFASKQQQH	QQQQQQQQQS	TPLVFSSPAL	<b>V</b> <b>D</b> <b>C</b> <b>H</b> <b>Y</b>	
POPTR_000803220.1	LTPMTIESEE	PKRARNVLS-	-----LDL	<b>DLN</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>A</b>	----PEDD--	-KFASFASKQ	QQQQQQKQON	TSLVFTSPAL	<b>V</b> <b>D</b> <b>C</b> <b>H</b> <b>Y</b>	
POPTR_000901020.1	SSSATTESKI	HGDHHTTIK-	---PRNNLAL	<b>DLN</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>A</b>	----PEDD--	-----HHLR	ESKFQLSSTQ	QPLVFSSPAL	<b>V</b> <b>D</b> <b>C</b> <b>H</b> <b>Y</b>	
POPTR_000422650.1	SSSATAESNI	HGDHHQIK--	---PKNILAL	<b>DLN</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>A</b>	----PEDD--	-----HHLR	ESNFQFTSTR	QALVFSATAL	<b>V</b> <b>D</b> <b>C</b> <b>H</b> <b>Y</b>	
POPTR_000422650.2	SSSATAESNI	HGDHHQIK--	---PKNILAL	<b>DLN</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>A</b>	----PEDD--	-----HHLR	ESNFQFTSTR	QALVFSATAL	<b>V</b> <b>D</b> <b>C</b> <b>H</b> <b>Y</b>	
POPTR_000612340.1	ITTTTTSTMS	LGRK-----	---PRNNLQL	<b>DLN</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>D</b>	LLEPKGKCGK	FVEAKLHWHE	FAATDITTES	GGLGSSLVSF	SRKLRLP	
POPTR_000903280.1	DNELAVTYPP	FLPAIPVLK	SNSKRVLC	<b>DL</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>L</b>	----PMDQ--	-----N	ESELQLRK--	----AGTRPV	LKCFI--	
POPTR_000124250.1	HELAAVTQPP	FLPAVPVLK	SNSKRVLC	<b>DL</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>L</b>	----PMYQ--	-----N	DSELQLEK--	----VDRPM	LRCFI--	
POPTR_183300200.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
POPTR_000805110.1	ADPLSPSSD	HQQVVPVVK	SN-SRRVLC	<b>DLN</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>P</b>	-----	-----N	ENDMEL----	----FKLGNA	APIYS--	
POPTR_001021650.1	VDPLNPPSTD	DQKAVPVVK	SN-SRRVLC	<b>DLN</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>P</b>	-----	-----Y	ENDMEL----	----SWSS	SNYFV--	
POPTR_000909250.1	AAITTSDSGA	VGGGGVSQS	QSRSGGGFDF	<b>DLN</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>L</b>	----PEFEGPR	IGHQALLRDQ	EVESPLSGKK	PRLTSLQKE	KTGVVSL	
POPTR_000130260.1	AAITTSDGGA	VGGGGVIQSK	QSRSGGGFDF	<b>DLN</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>L</b>	----PEFEGPR	ISLQALCGDQ	EVESPLPGKK	PRLMFSLQKE	KTDMGSS	
POPTR_000212010.1	TSEGAGSTNT	RTHSH----	---NHSHHDF	<b>DLN</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>L</b>	----PEFS---	-SDFVVS	GD	EVMSPLPA-A	KRIRILMAPR	
POPTR_001401760.1	TSEGAGSTNT	RTHSHN----	---EF	<b>DLN</b> <b>I</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>L</b>	----PEFS---	-SCFVS	GD	EVMSPLPA-A	KKLRISMPPR	

**Supplementary data 3: MUSCLE alignment of the poplar two-fingered Q-type C2H2-ZFPs gene family. Conserved motifs identified with MEME and presented in Figure 1c are highlighted.**

different isoforms of Q-type ZFPs proteins inside the same species is not well understood. It is debatable whether the different signatures in the C-terminus of the ZF between Group G1 and Group G2 confer an ability to regulate different sets of genes and different plant regulation pathways.

Outside of the ZF motifs, a conserved DLN motif was found to be present at the C-terminus of all the sequences except in 11 sequences of Group G2, all belonging to monocot species. Two of these monocot sequences corresponded to TaZFP2 and TaZFP34, transcription factors of Q-type C2H2 subfamily in *T. aestivum*.<sup>11</sup> In their study, the authors reported that these two sequences of 135 AA and 176 AA, respectively, were full length and effectively lacked a DLN motif, like 20 other *T. aestivum* Q-type sequences out of the 27 full-length two-fingered proteins identified. Apart from POPTR\_1833s00200, which is probably a partial EST, all poplar sequences contain this domain (Fig. 2a). This DLN motif was first reported as the DLN box in *A. thaliana* Q-type C2H2 gene subfamily.<sup>33,34</sup> This DLN-box domain has been shown to confer a repression activity to these transcription factors.<sup>16,36,37</sup> Also, the DLN box corresponds to the EAR domain (ethylene-responsive element-binding factor (ERF)-associated amphiphilic repression domain) found in the ethylene-responsive element binding factor and auxin/indole-3-acetic acid families of transcriptional regulators.<sup>38</sup> Recent *in silico* analysis revealed two distinct conservation patterns of the EAR domain: LxLxL and DLNxxP. Interestingly, in all the poplar sequences, a proline (P) was found three or four AAs after the DLN motif, and a leucine (L) was present before the aspartate (D). The plant proteins containing these motifs are involved in developmental, hormonal and stress signalling pathways.<sup>38</sup> Although it should be tested experimentally, these results suggest that most of the poplar two-fingered Q-type C2H2 proteins could also be transcriptional repressors.

Two lysine-rich motifs were found: the KG/RKRS/TKR domain was localized in the N-terminal part of the proteins before the first ZF and the KKPK domain at the end of the first ZF (Fig. 1c; Supplementary data 3). The first lysine-rich motifs has already been described in *A. thaliana* C2H2 proteins (named the B box) and may function as targeting signals for the translocation of proteins to the nucleus (NLS-nuclear localization signal).<sup>33</sup> As the C2H2-ZFPs are known mainly as transcription factors, nuclear localization is necessary for their function. Most of the Q-type proteins of the phylogenetic tree (Supplementary data 1) contained either the first motif (Group G1) or the second motif (Group G2). However, part of the proteins from Group G2, including the proteins homologous to the C1-2iC subclass of *A. thaliana*, possessed both motifs.

Some monocot proteins of both Group G1 and Group G2 lacked these motifs, in particular the proteins that also lacked the DLN box. However, some plant transcription factors may lack an NLS, and they are thought to be imported into the nucleus by dimerizing with proteins that possess these signals.<sup>39</sup> Alternatively, these proteins could be involved in interaction with RNA or other proteins as described for some of the ZFPs<sup>2</sup> and do not need nuclear localization.

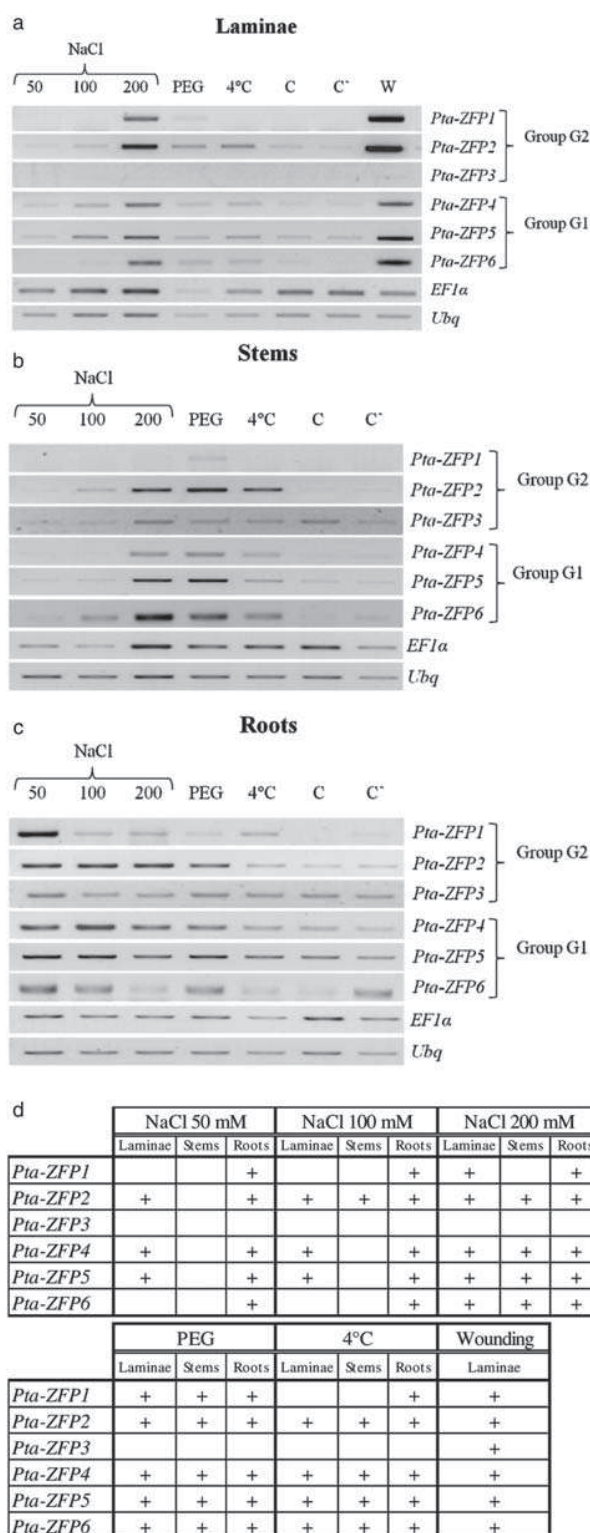
Another motif found to be widely distributed among Q-type C2H2 proteins corresponds to the CLIMLAR domain (Fig. 1c), localized between the first lysine-rich motif and the first ZF (Supplementary data 3). This motif was present in all sequences except in some of the Group G2 monocot proteins. However, the CLIMLAR *sensu stricto* (CLIMLAR) domain was present only in a part of Group G1, again excluding any monocots. Such distribution of the motif *sensu lato* (C/S/Y L I/ M/L/V M/L/A L A/S R/Q/K/N/H) or *sensu stricto* may reflect a different evolutionary story. This motif has been described as the L-Box domain (EXEXXAXCLXXL) in some C2H2 *A. thaliana* proteins and has been thought to be involved in protein–protein interactions or in maintaining the protein folding.<sup>33</sup>

Finally, two other motifs were identified: the MALEAL domain localized in the N-terminal part of some G1 proteins and the LVDCHY domain located at the C-terminus end of some G2 proteins (Fig. 2b). The MALEAL motif was restricted to 42 out of the 50 eudicot proteins of Group G1 and the LVDCHY domain in 24 out of the 60 eudicot proteins of Group G2 (Fig. 1a and b). Interestingly, the MALEAL motif was completely absent in monocot sequences of Group G1, whereas the LVDCHY domain was detected in five monocot sequences of Group G2. The distribution between Group G1 and Group G2 of each motif was very strict: no Group G1 sequence possessed the LVDCHY motif and no Group G2 sequence possessed the MALEAL motif. This strict distribution reinforces the phylogenetic separation already shown with ZFs. These motifs have not been described before in other Q-type C2H2 proteins and no function has been assigned to these domains. However, such cluster distribution may indicate a distinct role for the corresponding proteins in regulation or response to specific stresses.

### 3.3. Expression pattern of poplar two-fingered Q-type C2H2-ZFPs in various organs and in response to different stresses

Numerous studies have shown a role for C2H2 Q-type genes in response to different environmental





**Figure 3.** Accumulation of *PtaZFP1*, *PtaZFP2*, *PtaZFP3*, *PtaZFP4*, *PtaZFP5* and *PtaZFP6* transcripts after different treatments in laminae (a), stems (b) and roots (c) of *P. tremula* × *P. alba* plants. Total RNAs were extracted from control plants (C and C') or from treated plants (NaCl 50, 100 or 200 mM, PEG 20% (w/v), cold treatment at 4°C or wounding (for laminae only) 1 h after the treatment. Changes in the abundance *PtaZFP1*, *PtaZFP2*,

stimuli.<sup>6</sup> In poplar, *PtaZFP2* mRNAs accumulated strongly and rapidly after stem bending, i.e. mechanical loading.<sup>22</sup> For a better characterization of this gene subfamily in poplar, we studied the expression of different poplar two-fingered C2H2-ZFPs in different organs (leaf laminae, stems, roots) and in response to various treatments [salt, osmotic stress (PEG), cold stress (4°C), wounding (W) and bending]. As our poplar model species corresponded to the *P. tremula* × *P. alba* hybrid, we searched for homologous sequences of *P. trichocarpa* genes in the PopulusDB database, where cDNA libraries were built from *P. tremula* or *P. tremula* × *P. tremuloides* (*Populus* section) samples. We then designed specific primers outside the conserved regions to amplify, by RT-PCR, several *P. tremula* × *P. alba* Q-type C2H2 sequences corresponding to different groups in the phylogenetic tree. Three of these genes are included in Group G2 of the poplar phylogenetic tree (Fig. 2a): *PtaZFP2*, isolated earlier,<sup>22</sup> is orthologous to POPTR-0001s24250, its closest homologous gene *PtaZFP1* homologous to POPTR-0009s03280 and *PtaZFP3* corresponding to POPTR-0010s21650 (Fig. 2a). Three other sequences were chosen in Group G1 (*PtaZFP4*, *PtaZFP5* and *PtaZFP6*) that correspond, respectively, to POPTR\_0009s09250, POPTR\_0001s30260 and POPTR\_0014s01760 (Fig. 2a). As shown in Fig. 3, all mRNAs isoforms were detected in laminae, stems and roots, except for *PtaZFP3* which were not detected in the laminae. *PtaZFP3* was found to be poorly regulated in all organs, whatever the applied treatments, and will not be described further. When poplar plants were not subjected to any treatment (Fig. 3 lines C and C'), mRNA levels of all genes were higher in roots except for *PtaZFP1*. mRNA levels of the 5 Q-type C2H2 genes increased strongly in laminae after wounding treatment (Fig. 3a). The higher salt treatment (200 mM) also induced mRNA accumulation for all genes tested in all organs. In laminae, this mRNA induction was also observed for two Group G1 genes (*PtaZFP4* and *PtaZFP5*) and for one Group G2 gene (*PtaZFP2*) for the smaller salt concentration (50 and 100 mM) (Fig. 3a). In roots, mRNA levels were high whatever the salt concentration tested (Fig. 3c). The various treatments were directly applied in the nutritive solution where roots were directly and continuously in stress conditions. In the case of osmotic stress with PEG treatment, mRNA levels increased for all genes in all organs. The osmotic stress induced by PEG

*PtaZFP3*, *PtaZFP4*, *PtaZFP5* and *PtaZFP6* mRNAs were analysed by RT-PCR using specific primers (Supplementary data 1). As a control, the expression of *EF-1α* and ubiquitin (*Ubq*) genes are also shown. (d) Summary of the inductions of mRNA accumulation (+) observed in different agarose gels (a–c) according to each gene, organ and treatment.





treatment was close to the NaCl 200 mM treatment (hydraulic potential measurements:  $-1.3$  and  $-1$  MPa, respectively). mRNA induction was similar for the two treatments. Finally, the cold treatment induced all genes in laminae and stems except for *PtaZFP1* in laminae and stems. This study suggests that expression patterns are not clearly different between the different Q-type C2H2 genes in poplar whatever their position in the two phylogenetic groups. These results are in accordance with the role described for the *A. thaliana* Q-type C2H2 subfamily. For example, *ZAT10* gene (included in phylogenetic group G1) has been shown to be involved in the regulation pathway of osmotic, salinity and cold stresses.<sup>14</sup> Other transcriptomic analyses have described an important function of *A. thaliana* *ZAT12* gene (included in phylogenetic group G2) in strong light, osmotic, oxidative and also cold stresses.<sup>15,40</sup> However, in our study, all stresses (NaCl, PEG and cold) had an osmotic and therefore mechanical component. This may explain similarities in gene responses.

*PtaZFP2* has already been shown to be implicated in mechanical stress.<sup>22</sup> To test the putative role of other poplar Q-type C2H2 genes in response to mechanical loading, we subjected poplar plants to stem bending and studied the expression of the six genes in the stem at different times after treatment. As shown in Fig. 4, only the expression of *PtaZFP2* and *PtaZFP1* genes was strongly induced by mechanical loading in stems. The maximum mRNA accumulation occurred between 15 and 30 min after bending. Except for *PtaZFP3*, by increasing the cycle number of PCR, a small mRNA increase was also detected for the other poplar genes but to a much lower extent (data not shown). These variations were difficult to detect experimentally, but the plant might be able

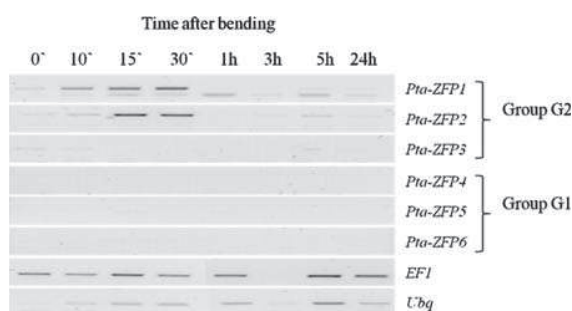
to perceive these slight inductions. Interestingly, *PtaZFP1* mRNA accumulation occurred earlier than for *PtaZFP2*. A previous work on *A. thaliana* suggested a possible cascade between the different C2H2 genes during a signalling pathway. For example, *ZAT12* is necessary for the expression of *ZAT7* in response to oxidative stress.<sup>41</sup> In the same way, a C2H2-ZFPs cascade might exist in poplar.

### 3.4. Upstream regulation of the two mechanosensitive genes *PtaZFP1* and *PtaZFP2*

Whereas physiological responses to mechanical stress are well described,<sup>42–46</sup> little is known about the regulation of molecular actors of the mechanical signalling pathway. Calcium is known to be an important second messenger involved in numerous transduction pathways including mechanoperception,<sup>47</sup> and several calmodulin-like (TCH2 and TCH3) proteins are involved in mechanical response in *A. thaliana* (for review, see Braam<sup>44</sup>). Other signalling molecules such as ROS and phytohormones (including jasmonates and ethylene) have been implicated in the mechanical transduction pathway.<sup>48</sup> As shown in Fig. 4, *PtaZFP1* and *PtaZFP2* Q-type C2H2 genes are the most responsive to mechanical stress in *P. tremula* × *P. alba*. The corresponding orthologous genes of *P. trichocarpa* are very close in the phylogenetic tree, the proteins sharing 83.8% similarity. Also, the promoter sequence of *PtaZFP2* contains putative *cis*-elements related to these signalling molecules.<sup>22</sup> We therefore studied putative signals involved in the regulation of these two mechanical responsive genes by testing the effect of calcium, ROS, ethylene, MeJA, ABA, GA and Chx on the expression of both genes in poplar cell cultures (Figs 5 and 6 for *PtaZFP1* and *PtaZFP2*, respectively).

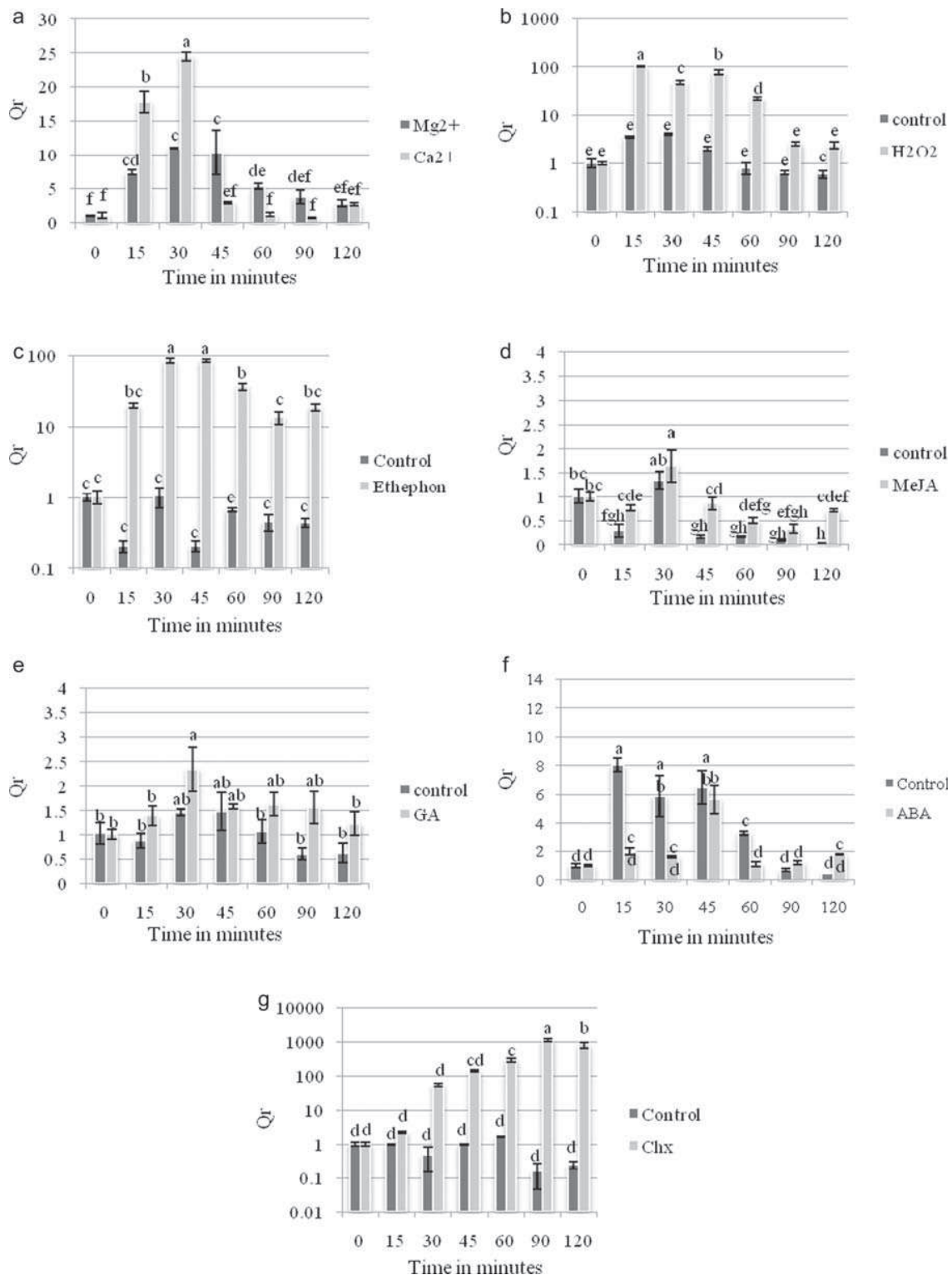
As shown in Fig. 5a, external calcium treatment (10 mM) seems to significantly induce *PtaZFP1* mRNA accumulation as little as 15 min after the treatment. In the case of *PtaZFP2*, the mRNA accumulation was weaker and not significantly different from the  $Mg^{2+}$  treatment used as control (Fig. 6a). In *A. thaliana*, some mechanosensitive genes have been shown to be regulated by calcium.<sup>49</sup> However, the calcium concentrations necessary to detect a significant increase in *TOUCH* genes expression were higher (50 mM, 100 mM) than those used in our study. With stronger but non-physiologic concentrations of  $Ca^{2+}$  (50 or 100 mM), *PtaZFP2* gene expression was also strongly induced (data not shown).

Concerning the effect of ROS, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) increased mRNA accumulation for both genes, with higher levels for *PtaZFP1* than for *PtaZFP2* (Figs 5b and 6b, respectively). Several Q-type C2H2 genes in other species have been shown to be responsive to  $H_2O_2$ .<sup>15,20</sup> Interestingly, transcriptome and



**Figure 4.** Time course accumulation of *PtaZFP1*, *PtaZFP2*, *PtaZFP3*, *PtaZFP4*, *PtaZFP5* and *PtaZFP6* transcripts after stem bending of *P. tremula* × *P. alba* plants. Total RNAs were extracted from the stems of control plants (C) and from bent stems at different times (10, 15, 30 min, 1, 3, 5 and 24 h). Changes in the abundance of *PtaZFP1*, *PtaZFP2*, *PtaZFP3*, *PtaZFP4*, *PtaZFP5* and *PtaZFP6* mRNAs were analysed by RT-PCR using specific primers (Supplementary data 1). As a control, the expression of *EF-1 $\alpha$*  and ubiquitin (*Ubq*) genes are also shown.

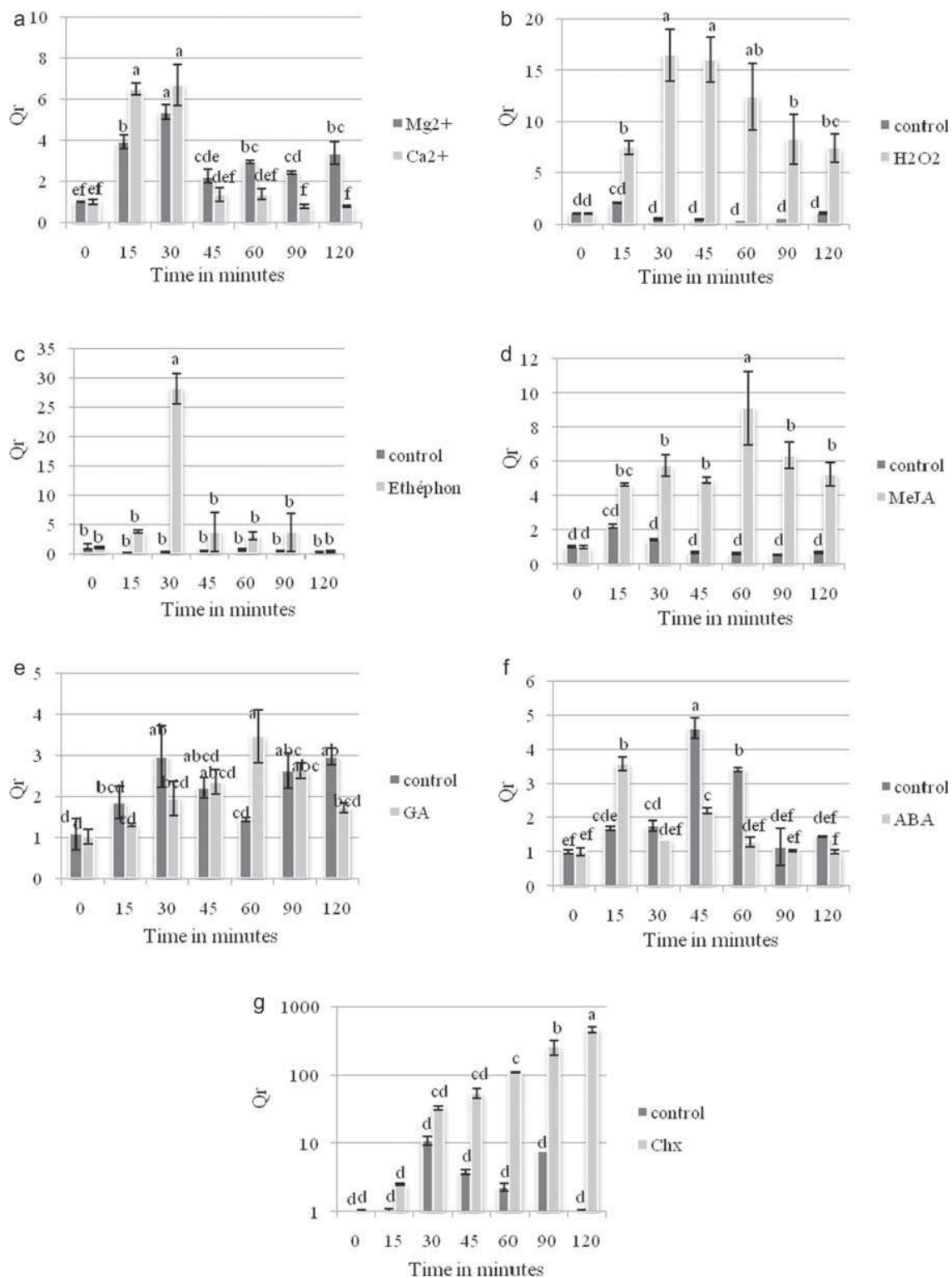




**Figure 5.** Time course accumulation of *PtaZFP1* transcripts after different treatments of *P. tremula* × *P. alba* cells cultures. (a) Calcium 10 mM ( $Ca^{2+}$ ; magnesium was used as osmotic control,  $Mg^{2+}$ ), (b) Hydrogen peroxide 500  $\mu$ M ( $H_2O_2$ ), (c) Ethephon 1 mM, (d) MeJA 100  $\mu$ M, (e) GA 100  $\mu$ M, (f) ABA 100  $\mu$ M and (g) Chx 50  $\mu$ M. Total RNAs were extracted at different times (0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min). The accumulation of relative transcripts ( $Q_r$ ) was determined by real-time quantitative PCR and it corresponds to the mean values of three independent experiments  $\pm$  SE. Significant differences ( $P < 0.05$ ) of responses between different times or treatment are indicated by different letters (Tukey's HSD test). For a better understanding, a semi-logarithmic scale has been used for b, c and g.







**Figure 6.** Time course accumulation of *PtaZFP2* transcripts after different treatments of *P. tremula* × *P. alba* cells cultures. (a) Calcium 10 mM (Ca<sup>2+</sup>; magnesium was used as osmotic control, Mg<sup>2+</sup>), (b) Hydrogen peroxide 500 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), (c) Ethephon 1 mM, (d) MeJA 100 μM, (e) GA 100 μM, (f) ABA 100 μM and (g) Chx 50 μM. Total RNAs were extracted at different times (0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min). The accumulation of relative transcripts (Qr) was determined by real-time quantitative PCR and it corresponds to the mean values of three independent experiments ± SE. Significant differences ( $P < 0.05$ ) of responses between different times or treatment are indicated by different letters (Tukey's HSD test). For a better understanding, a semi-logarithmic scale has been used for g.



transgenic plant analysis has shown that the *A. thaliana* *ZAT12* and *ZAT7* genes, included in the same phylogenetic group as *PtaZFP1* and *PtaZFP2*, are associated with the response of plants to ROS during abiotic stresses.<sup>15,41</sup>

In hormonal treatments, to test the effect of ethylene, ethephon (known to release ethylene in solution)<sup>50</sup> was added to cell culture medium. Both *PtaZFP1* and *PtaZFP2* mRNA levels increased 15 min after ethephon application (Figs 5c and 6c). Whereas the mRNA accumulation was very transient for *PtaZFP2*, it was stronger and longer for *PtaZFP1*. Such induction of Q-type C2H2 genes by ethylene has already been reported in *C. annuum*<sup>20</sup> and an ethylene burst was observed in response to mechanical stress.<sup>45,51</sup> However, some reports suggest that ethephon could release both ethylene and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into the medium<sup>52</sup> and so further analysis is needed to confirm the regulation of these genes by ethylene.

Among the other hormones tested (Figs 5d–f and 6d–f), only MeJA had a slight effect on *PtaZFP2* mRNA accumulation 30 min after the treatment (Fig. 6d). It has been demonstrated that wind and touch can induce the expression of lipoxygenase, the first enzyme of the biosynthesis pathway of jasmonate, in *T. aestivum*.<sup>53</sup> Also, the *STZ/ZAT10* gene of *A. thaliana* has recently been demonstrated to be involved in the jasmonic signalling pathway.<sup>54,55</sup> To our knowledge, no study has revealed the involvement of abscisic and GAs in the mechanical signalling pathway, in accordance with the results in this study.

As *PtaZFP1* and *PtaZFP2* gene expressions are induced very rapidly after stem bending, we tested whether they were primary genes by testing the effect of Chx, an inhibitor of protein synthesis in eukaryotic cells, alone or associated with ethephon. *PtaZFP1* and *PtaZFP2* mRNAs levels strongly increased with Chx treatment (Figs 5g and 6g) and by Chx associated with ethephon (data not shown). It thus seems that these genes may be primary genes whose expression may be regulated by the presence of a repressor on their promoters, as it has been demonstrated in other signalling pathway such as for genes responsive to auxin<sup>56</sup> or wounding.<sup>57</sup>

#### 4. Conclusion

Numerous studies have shown that Q-type C2H2 ZF proteins play a key role in plant acclimation to biotic and abiotic stresses.<sup>6</sup> However, the mode of regulation of C2H2 genes is complex and the specific role of each isoform in the different signal transduction pathways is still difficult to define. This study allowed the detection of two phylogenetic groups in

the Q-type C2H2 ZFPs in plants that are distinguished essentially in their different signatures at the C-terminus of their two QALGGH domains. As these protein domains are essential for DNA binding, these results suggest that proteins inside these two groups may regulate different sets of genes. Although the phylogenetic study was conducted only on the ZF-conserved motifs, two new motifs have been shown to be clearly associated with each group. These data confirm a phylogenetic relationship inside these groups. Concerning these two additional motifs MALEAL and LVDCHY revealed by this analysis, biochemical analyses of these proteins would help to define their importance in protein–protein interaction, protein folding or protein localization. The expression analysis of six poplar Q-type C2H2 ZFPs confirms their involvement in response to abiotic stresses such as cold, salt, osmotic and mechanical stresses. However, no real specificity of expression was detected between these genes towards these different stresses. However, as noted by Telewski,<sup>45</sup> a number of these abiotic stimuli induce plasma membrane deformation *via* turgor pressure variation and they can also be considered as mechanical stimuli similar to wind and gravity. Finally, despite the high protein similarity between *PtaZFP1* and *PtaZFP2* and the similar response of corresponding genes to mechanical stress, some differences have been revealed in their expression in response to signalling molecules such as calcium, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MeJA, suggesting their implication in different regulation pathways. It remains to be clarified how such signalling molecules could regulate these two genes in response to mechanical stress.

**Acknowledgements:** The authors are grateful to Christelle Boisselet for her help with plant and cells productions and to Sylvaine Labernia for her help in molecular experiments.

**Supplementary data:** Supplementary data are available at [www.dnaresearch.oxfordjournals.org](http://www.dnaresearch.oxfordjournals.org).

#### Funding

This research was funded by a Ministry of Research grant (to D.G.) and received support from the French Agence Nationale de la Recherche, grant ANR-09-BLAN-0245-01.

#### References

1. Takatsuji, H. 1999, Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science, *Plant Mol. Biol.*, **39**, 1073–8.



2. Wolfe, S., Nekludova, L. and Pabo, C. 2000, DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**, 183–212.
3. Englbrecht, C.C., Schoof, H. and Bohm, S. 2004, Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the Arabidopsis thaliana genome, *BMC Genomics*, **5**, 39.
4. Qu, L.-J. and Zhu, Y.-X. 2006, Transcription factor families in Arabidopsis: major progress and outstanding issues for future research, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**, 544–9.
5. Mitsuda, N. and Ohme-Takagi, M. 2009, Functional analysis of transcription factors in arabidopsis, *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1232–48.
6. Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R. 2008, The zinc finger network of plants, *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 1150–60.
7. Takatsuji, H. and Matsumoto, T. 1996, Target-sequence recognition by separate-type Cys2/His2 zinc finger proteins in plants, *J. Biol. Chem.*, **271**, 23368–73.
8. Kubo, K., Sakamoto, A., Kobayashi, A., et al. 1998, Cys(2)/His(2) zinc-finger protein family of petunia: evolution and general mechanism of target-sequence recognition, *Nucleic Acids Res.*, **26**, 608–15.
9. Bohm, S., Frishman, D. and Mewes, H.W. 1997, Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2464–9.
10. Agarwal, P., Arora, R., Ray, S., et al. 2007, Genome-wide identification of C2H2 zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis, *Plant Mol. Biol.*, **65**, 467–85.
11. Kam, J., Gresshoff, P., Shorter, R. and Xue, G.-P. 2008, The Q-type C2H2 zinc finger subfamily of transcription factors in Triticum aestivum is predominantly expressed in roots and enriched with members containing an EAR repressor motif and responsive to drought stress, *Plant Mol. Biol.*, **67**, 305–22.
12. Gamsjaeger, R., Liew, C.K., Loughlin, F.E., Crossley, M. and Mackay, J.P. 2007, Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs, *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 63–70.
13. Sakamoto, H., Maruyama, K., Sakuma, Y., et al. 2004, Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions, *Plant Physiol.*, **136**, 2734–46.
14. Mittler, R., Kim, Y., Song, L., et al. 2006, Gain- and loss-of-function mutations in Zat10 enhance the tolerance of plants to abiotic stress, *FEBS Lett.*, **580**, 6537–42.
15. Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J. and Mittler, R. 2005, The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, **139**, 847–56.
16. Ciftci-Yilmaz, S., Morsy, M.R., Song, L., et al. 2007, The EAR-motif of the Cys2/His2-type zinc finger protein Zat7 plays a key role in the defense response of Arabidopsis to salinity stress, *J. Biol. Chem.*, **282**, 9260–68.
17. Wu, C., You, C., Li, C., et al. 2008, RID1, encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor, acts as a master switch from vegetative to floral development in rice, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 12915–20.
18. Takatsuji, H., Mori, M., Benfey, P.N., Ren, L. and Chua, N.H. 1992, Characterization of a zinc finger DNA-binding protein expressed specifically in Petunia petals and seedlings, *EMBO J.*, **11**, 241–9.
19. Sugano, S., Kaminaka, H., Rybka, Z., et al. 2003, Stress-responsive zinc finger gene ZPT2–3 plays a role in drought tolerance in petunia, *Plant J.*, **36**, 830–41.
20. Kim, S.H., Hong, J.K., Lee, S.C., Sohn, K.H., Jung, H.W. and Hwang, B.K. 2004, CAZFP1, Cys2/His2-type zinc-finger transcription factor gene functions as a pathogen-induced early-defense gene in Capsicum annuum, *Plant Mol. Biol.*, **55**, 883–904.
21. Xu, S., Wang, X. and Chen, J. 2007, Zinc finger protein 1 (ThZF1) from salt cress (Thellungiella halophila) is a Cys-2/His-2-type transcription factor involved in drought and salt stress, *Plant Cell Rep.*, **26**, 497–506.
22. Martin, L., Leblanc-Fournier, N., Azri, W., et al. 2009, Characterization and expression analysis under bending and other abiotic factors of PtaZFP2, a poplar gene encoding a Cys2/His2 zinc finger protein, *Tree Physiol.*, **29**, 125–36.
23. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., et al. 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389–402.
24. Bailey, T.L. and Elkan, C. 1994, Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. In: Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, AAAI Press, Menlo Park, CA, pp. 28–36.
25. Edgar, R.C. 2004, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1792–7.
26. Guindon, S. and Gascuel, O. 2003, A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood, *Syst. Biol.*, **52**, 696–704.
27. Abascal, F., Zardoya, R. and Posada, D. 2004, ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution, *Bioinformatics*, **21**, 2104–5.
28. Morizet, J. and Mingeau, M. 1976, Effect of environment on water-uptake, as studied on beheaded exuding tomato. 1. Role of nutrients, *Ann. Agronomy*, **27**, 183–205.
29. Martin, L., Leblanc-Fournier, N., Julien, J.L., Moulia, B. and Coutand, C. 2010, Acclimation kinetics of physiological and molecular responses of plants to multiple mechanical loadings, *J. Exp. Botany*, **61**, 2403–12.
30. Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J. 1993, A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees, *Plant Mol. Biol. Rep.*, **11**, 113–6.
31. McMaugh, S. and Lyon, B. 2003, Real-time quantitative RT–PCR assay of gene expression in plant roots during fungal pathogenesis, *Biotechniques*, **34**, 982–6.
32. Tuskan, G.A., DiFazio, S., Jansson, S., et al. 2006, The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray), *Science*, **313**, 1596–604.
33. Sakamoto, H., Araki, T., Meshi, T. and Iwabuchi, M. 2000, Expression of a subset of the Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger protein gene family under water stress, *Gene*, **248**, 23–32.



34. Meissner, R. and Michael, A.J. 1997, Isolation and characterisation of a diverse family of Arabidopsis two and three-fingered C2H2 zinc finger protein genes and cDNAs, *Plant Mol. Biol.*, **33**, 615–24.
35. Yoshioka, K., Fukushima, S., Yamazaki, T., Yoshida, M. and Takatsuji, H. 2001, The plant zinc finger protein ZPT2–2 has a unique mode of DNA interaction, *J. Biol. Chem.*, **276**, 35802–7.
36. Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M. 2001, Repression domains of Class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression, *Plant Cell*, **13**, 1959–68.
37. Kazan, K. 2006, Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif-containing repressors, *Trends Plant Sci.*, **11**, 109–12.
38. Kagale, S., Links, M.G. and Rozwadowski, K. 2010, Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, **152**, 1109–34.
39. Goldfarb, A.N. and Lewandowska, K. 1994, Nuclear redirection of a cytoplasmic helix-loop-helix protein via heterodimerization with a nuclear localizing partner, *Exp. Cell Res.*, **214**, 481–5.
40. Vogel, V. 2006, Mechanotransduction involving multi-modular proteins: converting force into biochemical signals, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **35**, 459–88.
41. Rizhsky, L., Davletova, S., Liang, H. and Mittler, R. 2004, The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in Arabidopsis, *J. Biol. Chem.*, **279**, 11736–43.
42. Coutand, C. and Moulia, B. 2000, Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal, *J. Exp. Botany*, **51**, 1825–42.
43. Moulia, B. and Combes, D. 2004, Les régulations mécanoperceptives de la croissance : mécanismes éco-physiologiques et importance en conditions agronomiques, Séminaire de l'UMR Grandes Cultures INRA Grignon.
44. Braam, J. 2005, In touch: plant responses to mechanical stimuli, *New Phytol.*, **165**, 373–89.
45. Telewski, F.W. 2006, A unified hypothesis of mechanoperception in plants, *Am. J. Bot.*, **93**, 1466–76.
46. Coutand, C., Martin, L., Leblanc-Fournier, N., Decourteix, M., Julien, J.-L. and Moulia, B. 2009, Strain mechanosensing quantitatively controls diameter growth and PtaZFP2 gene expression in Poplar, *Plant Physiol.*, **151**, 223–32.
47. Knight, M.R., Smith, S.M. and Trewavas, A.J. 1992, Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 4967–71.
48. Chehab, E.W., Eich, E. and Braam, J. 2009, Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation, *J. Exp. Botany*, **60**, 43–56.
49. Braam, J. 1992, Regulated expression of the calmodulin-related TCH genes in cultured Arabidopsis cells: induction by calcium and heat shock, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 3213–6.
50. Zhang, W. and Wen, C.-K. 2010, Preparation of ethylene gas and comparison of ethylene responses induced by ethylene, ACC, and ethephon, *Plant Physiol. Biochem.*, **48**, 45–53.
51. Goeschl, J.D., Rappaport, L. and Pratt, H.K. 1966, Ethylene as a factor regulating the growth of pea epicotyls subjected to physical stress, *Plant Physiol.*, **41**, 877–84.
52. Alonso, J.M. and Ecker, J.R. 2001, The ethylene pathway: a paradigm for plant hormone signaling and interaction, *Sci. STKE*, **2001**, re1-.
53. Mauch, F., Kmecl, A., Schaffrath, U., et al. 1997, Mechanosensitive expression of a lipoxygenase gene in wheat, *Plant Physiol.*, **114**, 1561–6.
54. Pauwels, L. and Goossens, A. 2008, Fine-tuning of early events in the jasmonate response, *Plant Signal. Behav.*, **3**, 846–7.
55. Pauwels, L., Morreel, K., De Witte, E., et al. 2008, Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells, *Proc. Natl Acad. Sci.*, **105**, 1380–5.
56. Abel, S. and Theologis, A. 1996, Early genes and auxin action, *Plant Physiol.*, **111**, 9–17.
57. Chung, H.S., Koo, A.J.K., Gao, X., et al. 2008, Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory, *Plant Physiol.*, **146**, 952–64.





## *Chapitre 2*

*Régulation de l'expression de  $PtaZFP2$*

*suite à une stimulation mécanique*

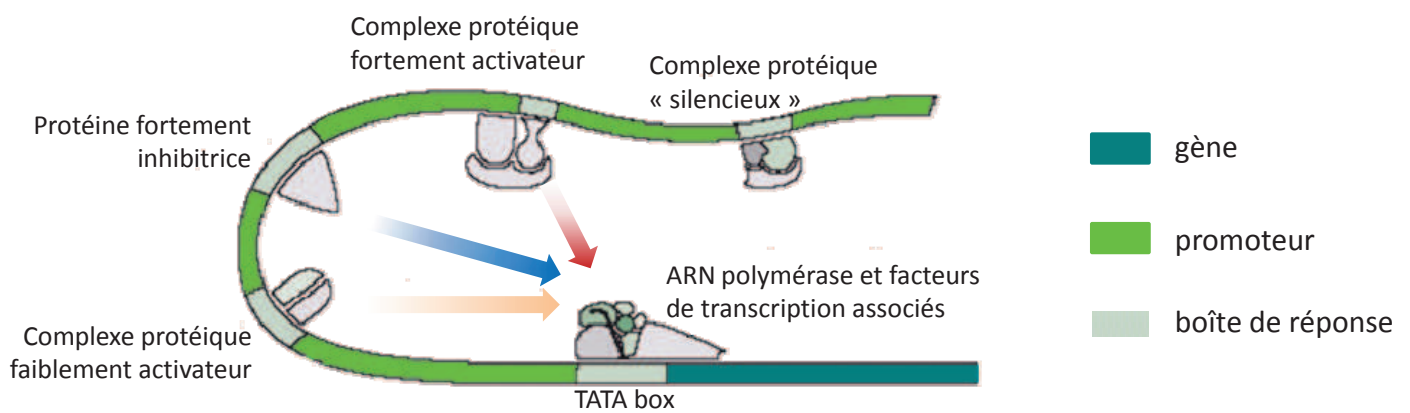


## A. Introduction

Comme nous l'avons souligné dans la synthèse bibliographique, ni les acteurs moléculaires de la mécanoperception, ni le mode de régulation de celle-ci ne sont complètement identifiés chez les plantes. La deuxième partie de ce travail de thèse a pour objectif de comprendre les étapes précoces entre la mécanoperception et l'expression des gènes mécanosensibles.

Le modèle biomécanique de mécanoperception proposé au laboratoire prédit que, lors d'une sollicitation mécanique, chaque cellule percevrait la déformation de sa membrane plasmique et produirait un signal dont l'intensité est directement corrélée à l'intensité de la déformation perçue. Au sein d'un tissu, le signal produit correspond à la somme des signaux produits par chaque cellule composant ce tissu et ayant subi une déformation. Ce modèle a été confirmé au niveau tissulaire : dans la zone fléchie de la tige, l'expression de *PtaZFP2* est corrélée linéairement à la somme des déformations longitudinales subies par les cellules et calculée sur cette portion de tige (Coutand *et al.*, 2009). Nous souhaitons dans un premier temps mettre au point un système de sollicitation mécanique permettant de valider ce modèle au niveau cellulaire. La première étape de ce travail a donc consisté à mettre en place un système de sollicitation mécanique quantifiable sur des cellules de peuplier. Deux techniques ont été testées successivement : la première repose sur le principe d'inclure des cellules dans un gel d'agarose et de réaliser une compression contrôlée du gel, la seconde technique consiste à modifier l'agitation des cultures cellulaires.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à comprendre la régulation du gène *PtaZFP2* suite à une sollicitation mécanique. Dans le premier chapitre, nous avons identifié plusieurs molécules capables de réguler l'expression de *PtaZFP2* selon une cinétique similaire à celle observée suite à une flexion de la tige : calcium, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et jasmonates (Gourcilleau *et al.*, soumis). Toutefois, nous avons également mis en évidence que ce gène pouvait être régulé par d'autres stress abiotiques. Il semblait donc intéressant de (1) retrouver parmi les molécules capables de réguler l'expression de *PtaZFP2* celles qui sont effectivement impliquées dans la voie de signalisation d'une sollicitation mécanique et (2)



**Figure 27 : Schématisation d'un promoteur.** Le promoteur, situé en amont du gène dont il régule l'expression, possède des éléments *cis*-régulateurs (boîtes de réponse) capables de fixer des facteurs de transcription activateurs (activation représentée par des flèches rouges) ou inhibiteurs (inhibition représentée par des flèches bleues) agissant sur l'ARN polymérase, elle-même fixée sur une TATA-box.

identifier quelles sont les régions ou éléments *cis*-régulateurs du promoteur impliqués dans cette mécanoperception.

Pour tester si ces molécules identifiées dans la première partie (calcium, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et jasmonates) régulent l'expression de *PtaZFP2* dans le cadre de la réponse à la sollicitation mécanique, nous avons utilisé une approche pharmacologique en étudiant l'effet d'inhibiteurs de ces différentes voies sur l'induction de l'expression de *PtaZFP2*.

Les promoteurs (ou séquences promotrices) sont des séquences situées en amont de la séquence codante d'un gène. La fixation de l'ARN polymérase sur un promoteur au niveau de la séquence consensus TATAAT (boîte TATA), située 25 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, et l'activation de cette ARN polymérase, sont contrôlées par des facteurs de transcription (éléments *trans*-régulateurs), eux-mêmes fixés sur des séquences *cis*-régulatrices du promoteur (Figure 27). Ces séquences *cis*-régulatrices sont également appelées éléments de réponse ou boîtes de réponse. Ainsi, en se fixant sur ces séquences situées à des distances variables du site d'initiation de la transcription, les facteurs de transcription régulent l'activité de l'ARN polymérase. On trouve des facteurs de transcription de type activateur et d'autres de type répresseur : l'activité de l'ARN polymérase résultera alors de l'ensemble des signaux reçus.

Identifier les boîtes de réponse au signal mécanique au sein d'un promoteur permet donc d'accéder potentiellement aux facteurs de transcription régulant le gène correspondant. Au commencement de ce travail de thèse, les promoteurs des gènes codant pour les protéines Q-type C2H2-ZFP n'avaient pas été analysés. De plus, seule une boîte de réponse potentiellement impliquée dans le stress mécanique a été identifiée, par une approche *in silico* basée sur l'analyse bioinformatique de tous les promoteurs des gènes induits par la blessure (stress mécanique lésant) chez *Arabidopsis thaliana* (Walley *et al.*, 2007). La région 5' en amont de la séquence codante du gène *PtaZFP2* a été isolée précédemment par criblage par PCR d'une banque d'ADN génomique (Martin *et al.*, 2009). Une région de 2,2 kb avait été initialement isolée mais les 700 premières paires de base montraient une forte homologie avec un ADNc de racine de peuplier : un fragment de 1512 pb a été finalement conservé (Martin, 2009). Une analyse avec le logiciel PLACE Web Signal Scan a permis d'identifier plus de 330 éléments de réponse potentiels ; la Figure 26 de la synthèse bibliographique présente certains de ces éléments régulateurs communs aux autres



promoteurs eucaryotes (Martin *et al.*, 2009). Sur un promoteur, tous les éléments *cis*-régulateurs identifiés *in silico* ne sont pas forcément fonctionnels. Par exemple, de nombreuses boîtes de réponse à l'obscurité sont présentes sur le promoteur de *PtaZFP2* alors que le niveau d'expression du gène à l'obscurité n'est pas différent de celui détecté à la lumière en condition témoin (Figure 22 de la synthèse bibliographique) (Martin *et al.*, 2009).

Afin de tester quelles régions du promoteur sont impliquées dans la régulation de *PtaZFP2*, nous avons réalisé des délétions successives du promoteur de *PtaZFP2* placées en amont des gènes rapporteurs *GUS* et *GFP*, et testé la réponse des constructions au stress mécanique et à différents traitements.





## B. Matériel et Méthodes

### 1. Cultures cellulaires

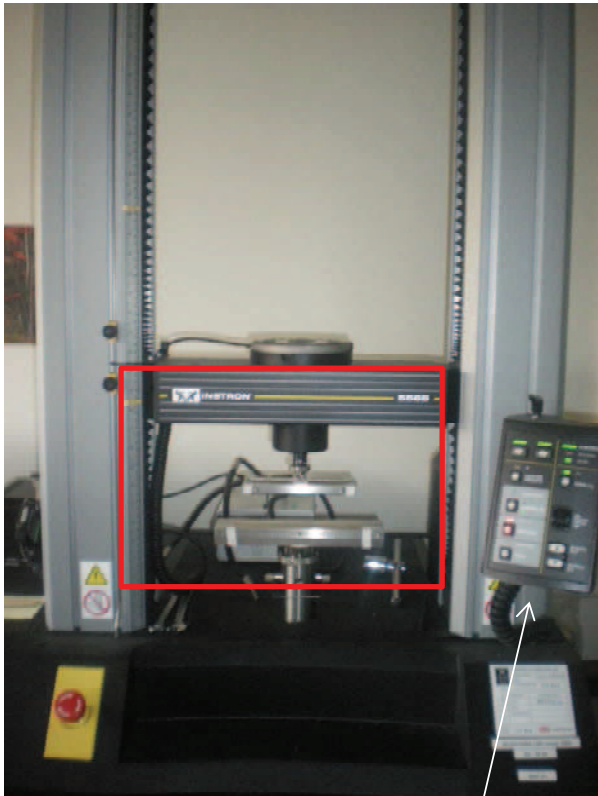
Les cultures cellulaires de peuplier (*Populus tremula x alba*, clone 717-1B4) ont été initiées en transférant 2 à 3 g de cal « frais » dans 20 mL de milieu MB5 liquide (Annexe 1) additionné de 2 mg.mL<sup>-1</sup> d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), 0,2 g.L<sup>-1</sup> de L-glutamine et 1 mg.L<sup>-1</sup> de vitamines (acide nicotinique, chlorhydrate de pyridoxine et chlorhydrate de thiamine). Elles ont été maintenues à l'obscurité sous une agitation douce (120 rpm) dans une chambre de culture à 23°C pendant au moins 8 jours et ont été réensemencées tous les 4 jours en mettant 10 mL de la culture cellulaire dans 40 mL de milieu MB5 liquide frais additionné de 2 mg.mL<sup>-1</sup> d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), 0,2 g.L<sup>-1</sup> de L-glutamine et 1 mg.L<sup>-1</sup> de vitamines (acide nicotinique, chlorhydrate de pyridoxine et chlorhydrate de thiamine).

71

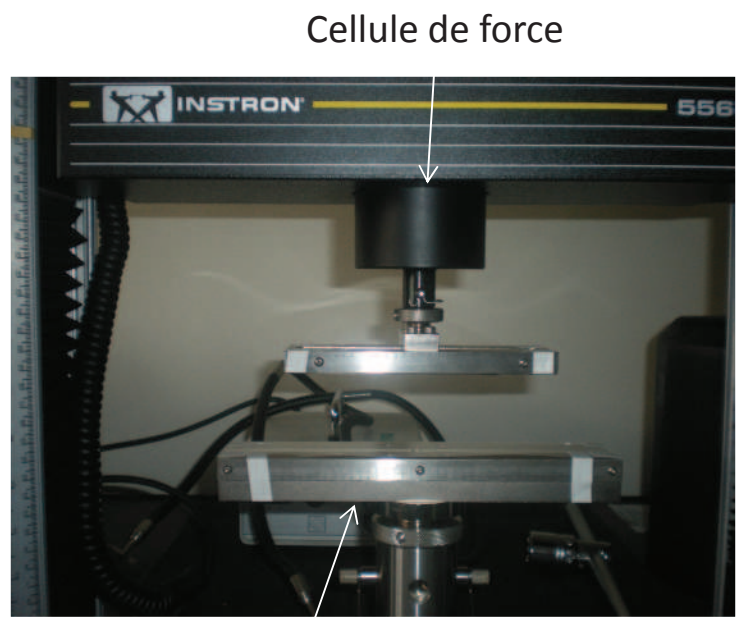
### 2. Application d'une sollicitation mécanique

#### a. Compression de gels d'agarose

40 mL de culture cellulaire de peuplier (environ 12 g de cellules) ont été incubés pendant 10 min avec 400 µL de rouge neutre (colorant vital, 1%). Après sédimentation des cellules, le milieu de culture (coloré en rouge) est retiré et 20 mL de milieu MB5 liquide frais additionné de 2 mg.mL<sup>-1</sup> d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), 0,2 g.L<sup>-1</sup> de L-glutamine et 1 mg.L<sup>-1</sup> de vitamines (acide nicotinique, chlorhydrate de pyridoxine et chlorhydrate de thiamine) ont été ajoutés. La culture cellulaire a été placée dans un bain-marie dont la température est ajustée progressivement à 35°C. Parallèlement, 3,6 g d'agarose low melting (Sigma) sont dissous dans 100 mL de ce même milieu. Ce gel est incubé lui aussi à 35°C afin d'éviter un choc thermique pour les cellules. Après avoir atteint la bonne température, les 20 mL de culture cellulaire sont mélangés au gel puis la solution est coulée dans un moule. La



Système de  
pilotage



Plateaux de  
compression

**Figure 28 : Machine d'essai de traction/compression Instron (modèle 5565) utilisée pour effectuer les tests de compression de gels d'agarose.**

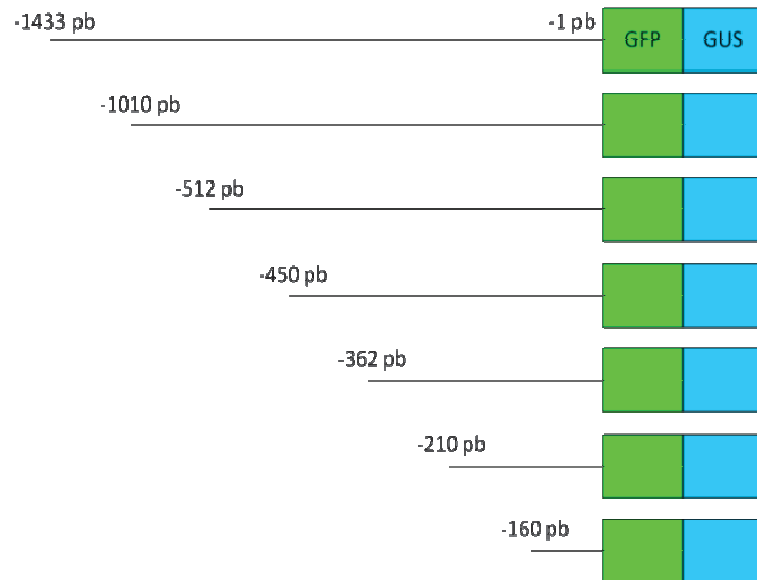
concentration finale du gel d'agarose est donc de 3%. Après polymérisation, le gel est démoulé, immergé dans du milieu de culture afin d'éviter le dessèchement et placé en chambre de culture (23°C, obscurité). Pour s'affranchir du stress lié à l'inclusion des cellules dans le gel d'agarose (stress mécanique et thermique), les tests de compression ont été effectués 24h après la réalisation de ces gels.

Des parallélépipèdes rectangles de 60x35x15 mm<sup>3</sup> ont été découpés. Ces éprouvettes ont été sollicitées en compression entre 2 plaques en acier recouverte de plexiglas à l'aide d'une machine d'essai (Instron, modèle 5565, Figure 28). Les vitesses de sollicitation testées étaient typiquement de 1%.min<sup>-1</sup> et le taux de compression maximum de 25%. Un appareil photo numérique a été utilisé pour photographier toutes les minutes la face latérale de l'échantillon et suivre l'état de déformation des cellules au cours de l'essai. A la fin de l'essai, l'échantillon est laissé au repos pendant 10 minutes (délai d'expression de *PtaZFP2* en réponse à une sollicitation mécanique (Martin *et al.*, 2009)) avant d'être plongé dans de l'azote liquide puis conservé à -80°C jusqu'à analyse.

### **b. Sollicitation par agitation**

Des aliquots de 5 mL de culture cellulaire de peuplier (environ 1,5 g) de 4 jours ont été placés dans des tubes stériles de 15 mL et laissés sous agitation à 120 rpm à l'obscurité et à 23°C pendant 2h afin de permettre aux cellules de « récupérer » de la sollicitation mécanique due à l'aliquotage (*PtaZFP2* revient à son niveau de base 2h après une sollicitation mécanique (Martin *et al.*, 2009)). Les cultures cellulaires ont alors été sollicitées mécaniquement en augmentant la vitesse de l'agitation à 325 rpm sur un agitateur rotatif. Les autres conditions de culture (23°C et obscurité) ont été maintenues pendant la durée de l'expérience.

a



b

Construction	Séquence de l'amorce utilisée	T°C d'hybridation
- 1433 à -1 pb	5'- CACCATCCGTGTTATGAAAGTTTGA -3'	60°C
- 1010 à -1 pb	5'- CACCTGAAACCAGGTTAACCCGGAA -3'	60°C
- 512 à -1 pb	5'- CACCTTAATAGGGGTTTCTACATGA -3'	55°C
- 451 à -1 pb	5'- CACCGGTCGGACTTGCACTCAATAT -3'	55°C
- 362 à -1 pb	5'- CACCCATCAATGACCGGATGTAAT -3'	55°C
- 210 à -1 pb	5'- CACCCATAATTGCCCTCAAGCAAAG -3'	55°C
- 160 à -1 pb	5'- CACCTCCTCCAACCTTATAAATA -3'	55°C

**Figure 29 : Représentation schématique du promoteur et des différentes constructions utilisées pour l'étude des régions régulatrices du promoteur du gène *PtaZFP2*.** (a) Le promoteur entier ou délété à différents niveaux est placé en amont des gènes rapporteurs de la *GFP* (Green Fluorescence Protein, vert) et *GUS* (Glucuronidase, bleu). Les chiffres font référence à la position par rapport au codon ATG (+1). (b) Amorces sens et conditions de PCR utilisées pour amplifier les différentes régions promotrices délétées du gène *PtaZFP2*.

### 3. Traitements cellulaires

Comme précédemment, des aliquots de 5 mL de culture cellulaire de 4 jours ont été placés dans des tubes stériles de 15 mL et laissés sous agitation à 120 rpm à l'obscurité et à 23°C pendant 2h afin d'annuler le stress mécanique du à l'aliquotage (Martin *et al.*, 2009).

Pour l'étude des inhibiteurs, les cellules ont été pré-traitées 1h avec du  $\text{LaCl}_3$  (Chlorure de lanthane, inhibiteur des canaux calciques, 0,5 mM), du  $\text{GdCl}_3$  (Chlorure de gadolinium, inhibiteur de canaux calciques mécanosensibles, 1 mM), du W7 (N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulphonamide, antagoniste des calmodulines, 200  $\mu\text{M}$ ), du W5 (N-(6-Aminoheptyl)-1-naphthalenesulfonamide, analogue du W7, 200 $\mu\text{M}$ ), du DIECA (DIEthyldithiocarbamic Acid, inhibiteur de la voie des jasmonates, 1,5 mM) ou du DPI (DiPhenylmelodinium chloride, inhibiteur de la production d'EAO, 100  $\mu\text{M}$ ). Ces différents produits ont été fournis par Sigma. L'agitation, l'obscurité et la température ont été maintenues durant toute la durée du prétraitement. Les cellules ont alors été soumises ou non (témoins) à une sollicitation mécanique (agitation à 325 rpm). A la fin du traitement, après sédimentation des cellules pendant 30 secondes à 1 minute, le milieu est retiré par pipetage. Les cellules ont été plongées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à analyse.

### 4. Production des constructions contenant le promoteur délété de *PtaZFP2*

*en amont des gènes rapporteurs GFP et GUS*

#### a. Clonage de régions progressivement délétées du promoteur de *PtaZFP2* par le système Gateway

Les différentes constructions du promoteur de *PtaZFP2* (Figure 29a) ont été obtenues par amplification par PCR à partir de 100 ng d'un plasmide pGEM-T Easy contenant le promoteur de *PtaZFP2* (bases -1512 à -1). Chaque réaction PCR a été réalisée avec 1X de tampon de réaction, 200  $\mu\text{M}$  de chaque dNTP, 0,4 à 1  $\mu\text{M}$  de chaque amorce et 1,8 U de *Pfu*

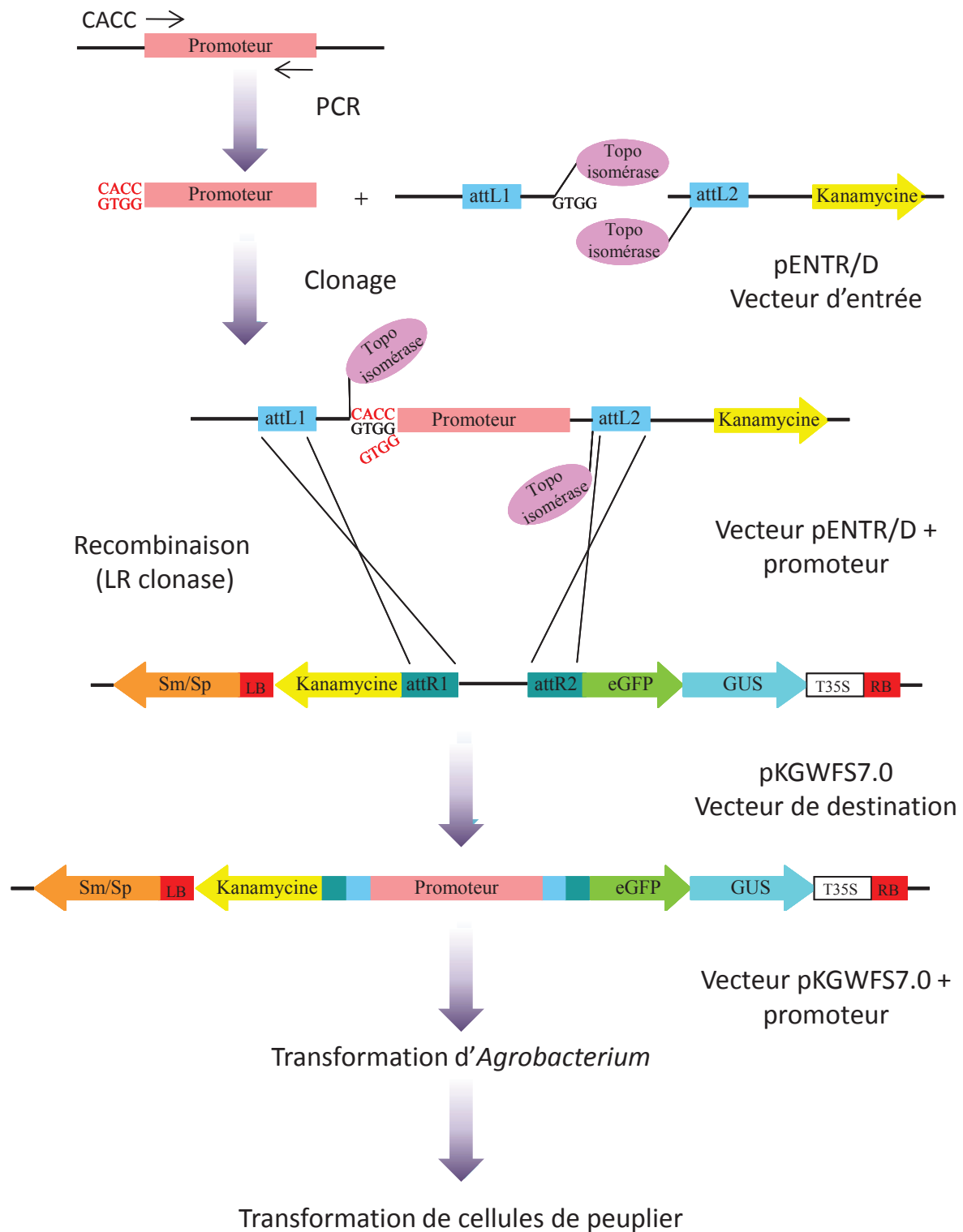


Figure 30 : Schéma représentatif des étapes de clonage réalisées pour produire les constructions contenant les délétions successives du promoteur du gène *PtZFP2* en amont des gènes rapporteurs *GFP* et *GUS*.

DNA polymerase (Promega, Madison, USA). Après une étape de chauffage à 95°C pendant 5 min, les conditions de cycles de PCR étaient de 31 cycles de dénaturation (95°C, 30 s)/hybridation des amorces (températures données en Figure 29b en fonction des amorces, 30 s)/élongation (72°C, 30 s) et terminées par une étape d'élongation à 72°C pendant 5 minutes. Les fragments d'ADN du promoteur ont été amplifiés en utilisant les amorces sens décrites dans la Figure 29b et l'amorce antisens Reverse 5'-GGTAATTAAGCTTACAGGTTAGAT-3' située au tout début du promoteur (bases -24 à -1). Les produits de PCR ont ensuite été séparés en gel d'agarose 0,8% puis excisés et purifiés à l'aide du kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences, Freiburg, Allemagne).

Les différentes étapes de l'obtention des constructions sont schématisées dans la Figure 30. Le clonage dans le vecteur d'entrée pENTR/D (Annexe 2) a été réalisé avec un ratio 0,4/1 à 1/1 (insert/vecteur) selon les recommandations du fournisseur (pENTR Directional TOPO® Cloning, Invitrogen). Des bactéries *E.coli* TOPO 10 compétentes ont été transformées par choc thermique avec la moitié de la réaction de clonage. Les colonies contenant les constructions désirées ont été sélectionnées avec de la kanamycine (50 µg.mL<sup>-1</sup>) et criblées par PCR sur colonies avec les amorces M13 (Annexe 2). Les ADN plasmidiques de chaque construction ont ensuite été isolés par la méthode de lyse alcaline. Les recombinaisons entre le vecteur d'entrée pENTR/D portant chacune des constructions et le vecteur de destination pKGWFS7.0 (Karimi *et al.*, 2002) ; Annexe 3) ont été réalisées avec l'enzyme LR clonase II selon les instructions du kit pENTR Directional TOPO® Cloning (Invitrogen). Les constructions finales ont été transférées dans des bactéries *E.coli* TOPO 10 par choc thermique, sélectionnées avec la spectinomycine (50 µg.mL<sup>-1</sup>) et criblées par PCR sur colonies avec les amorces spécifiques de chaque construction (Figure 29b). Les différentes constructions ont été séquencées pour vérification.

#### **b. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens***

La souche C58pMP90 d'*Agrobacterium tumefaciens* (Koncz and Schell, 1986) a été transformée avec les différentes constructions plasmidiques par électroporation selon la technique décrite par Mattanovich *et al.* (1989) (Mattanovich *et al.*, 1989). Les agrobactéries ont été décongelées sur la glace et 200 ng de plasmide pKGWFS7 modifié ont été ajoutés. La





suspension a ensuite été placée dans une cuve à électroporation avec des électrodes distantes de 0,2 cm. Une décharge électrique de 2800 V (soit  $14000 \text{ V.cm}^{-1}$ ) a été appliquée avec un électroporateur EC100 (EC Apparatus Corporation). Après la décharge, les agrobactéries ont immédiatement été placées dans 950  $\mu\text{L}$  de milieu LB liquide à  $28^\circ\text{C}$  pendant 2h. Les agrobactéries ont ensuite été étalées sur un milieu LB solide additionné des antibiotiques adaptés (gentamycine + rifampicine). Après une incubation de 48h à  $28^\circ\text{C}$ , les colonies étaient formées. La transformation et les constructions ont été vérifiées après extraction de l'ADN plasmidique et PCR avec les amorces appropriées.

### **c. Production des cellules de peuplier transgéniques**

Le protocole de transformation génétique du peuplier utilisé ici était celui de Leplé *et al.* (1992) (Leplé *et al.*, 1992). Des entre-noeuds de vitro-plants de peuplier (*Populus tremula x alba*, clone 717-1B4) âgés de 8 semaines ont été utilisés pour la transformation. Sur un papier stérile, les explants de 8 à 10 mm de long ont été excisés et fendus en deux sur la moitié de leur longueur. Ils ont alors été déposés sur milieu MS (Murashige and Skoog, 1962) modifié additionné d'une cytokinine et d'une auxine synthétiques, 2ip (N6-(2-isopentenyl)adenine, 5  $\mu\text{M}$ ) et ANA ( $\alpha$ -naphtaleine acetic acid, 10  $\mu\text{M}$ ) respectivement, à raison de 15 explants par boîte de pétri. Les boîtes scellées avec du parafilm ont été placées pendant 48h à l'obscurité et à  $24^\circ\text{C}$ . Les explants ont ensuite baignés dans une solution de co-culture contenant les agrobactéries transformées ( $\text{DO}_{600} = 0,3$ ), à raison de 45 explants dans 100 ml de co-culture. Les milieux ont alors été placés sous agitation à 125 tours/min, à l'obscurité et à  $24^\circ\text{C}$  pendant 16h. Suite à cette co-incubation en milieu liquide, les explants ont été déposés sur milieu solide pour deux jours supplémentaires de co-culture à l'obscurité à  $24^\circ\text{C}$ . Au terme des deux jours de co-incubation en milieu solide, les explants ont été prélevés et lavés avec de l'eau stérile (100 ml pour 45 explants). 7 lavages de 5 minutes sous agitation (125 tours/min) ont été réalisés afin d'éliminer le plus de bactéries possible. Les explants ont ensuite été tamponnés sur des serviettes en papier stériles et placés sur milieu de décontamination M2 (MS modifié + 2ip (5  $\mu\text{M}$ ) + ANA (10  $\mu\text{M}$ ) + céfotaxime ( $250 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + ticarcilline ( $400 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + kanamycine ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ )). La céfotaxime et la ticarcilline ont permis d'éliminer les agrobactéries. Les boîtes scellées avec du parafilm ont



été placées à l'obscurité à 24°C et les cals repiqués tous les 15 jours sur milieu M2 + kanamycine (50 mg.L<sup>-1</sup>) afin de favoriser la callogenèse. Les cals obtenus ont été utilisés pour initier les cultures cellulaires transformées.

**d. Traitements cellulaires des lignées transgéniques**

Des aliquots de 5 mL de culture cellulaire de 4 jours ont été placés dans des tubes stériles de 15 mL et laissés sous agitation à 120 rpm à l'obscurité et à 23°C pendant 2h afin de permettre aux cellules de récupérer de la sollicitation mécanique due à l'aliquotage.

Les cellules ont été traitées avec du calcium (CaCl<sub>2</sub>, 10 mM), de l'éthéphon (1 mM), du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 500 µM), ou de la cycloheximide (Chx, 50 µM). Ces différents produits ont été fournis par Sigma. L'agitation, l'obscurité et la température ont été maintenues durant toute la durée de l'expérience. A la fin du traitement, les cellules ont été laissées à sédimenter et le milieu retiré par pipetage. Les cellules ont été plongées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à analyse.

**e. Vérifications par PCR**

La transformation d'*Agrobacterium* par les différentes constructions et l'insertion des constructions dans l'ADN génomique des cellules de peupliers ont été vérifiées par amplifications PCR. Elles ont été réalisées directement sur colonies ou à partir de 100 ng d'ADN génomique de cellules de peuplier, en utilisant le Taq polymérase CORE Kit (Sigma), en suivant les instructions du fournisseur. Après une étape de chauffage à 95°C pendant 5 min, les conditions de cycles de PCR étaient de 40 cycles de dénaturation (95°C, 30 s)/hybridation des amorces (60°C, 30 s)/élongation (72°C, 30 s) et terminées par une étape d'élongation à 72°C pendant 5 minutes. Les amorces utilisées étaient les amorces pKGWF7 sens 5'-TCCCATATGGTCGACCTGCA-3' et anti-sens 5'-TCCTCGCCCTTGCTCACCAT-3' situées respectivement en amont et en aval des sites attR1 et attR2 d'insertion du promoteur (entier ou délété) dans le vecteur pKGWFS7 (Annexe 3). Les produits PCR ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose (1,5%).



## 5. *Extractions d'ARN et synthèse d'ADNc (RT)*

### a. Extraction d'ARNs à partir des gels d'agarose

Les gels d'agarose ont tout d'abord été lyophilisés puis broyés dans de l'azote liquide. Les ARNs totaux ont ensuite été extraits avec un tampon contenant du CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) selon le protocole détaillé dans l'Annexe 4 (Chang *et al.*, 1993).

77

### b. Extraction d'ARNs à partir de cultures cellulaires et synthèse d'ADNc

Les cellules ont été broyées dans de l'azote liquide puis les ARNs totaux ont été extraits en utilisant une extraction avec un tampon contenant du CTAB d'après un protocole adapté de celui décrit par Chang et ses collaborateurs (1993) puis traités avec la DNase RQ1 RNase-free (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Les ARNs ont été quantifiés par spectrophotométrie et leur état vérifié par électrophorèse en gel d'agarose. La synthèse du premier brin d'ADNc a été faite à partir de 1 µg d'ARNs totaux en utilisant le kit Superscript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) en suivant les instructions du fournisseur.

## 6. *Extractions d'ADN*

Les extractions d'ADN ont été réalisées avec un tampon contenant du CTAB selon le protocole détaillé dans l'Annexe 5.



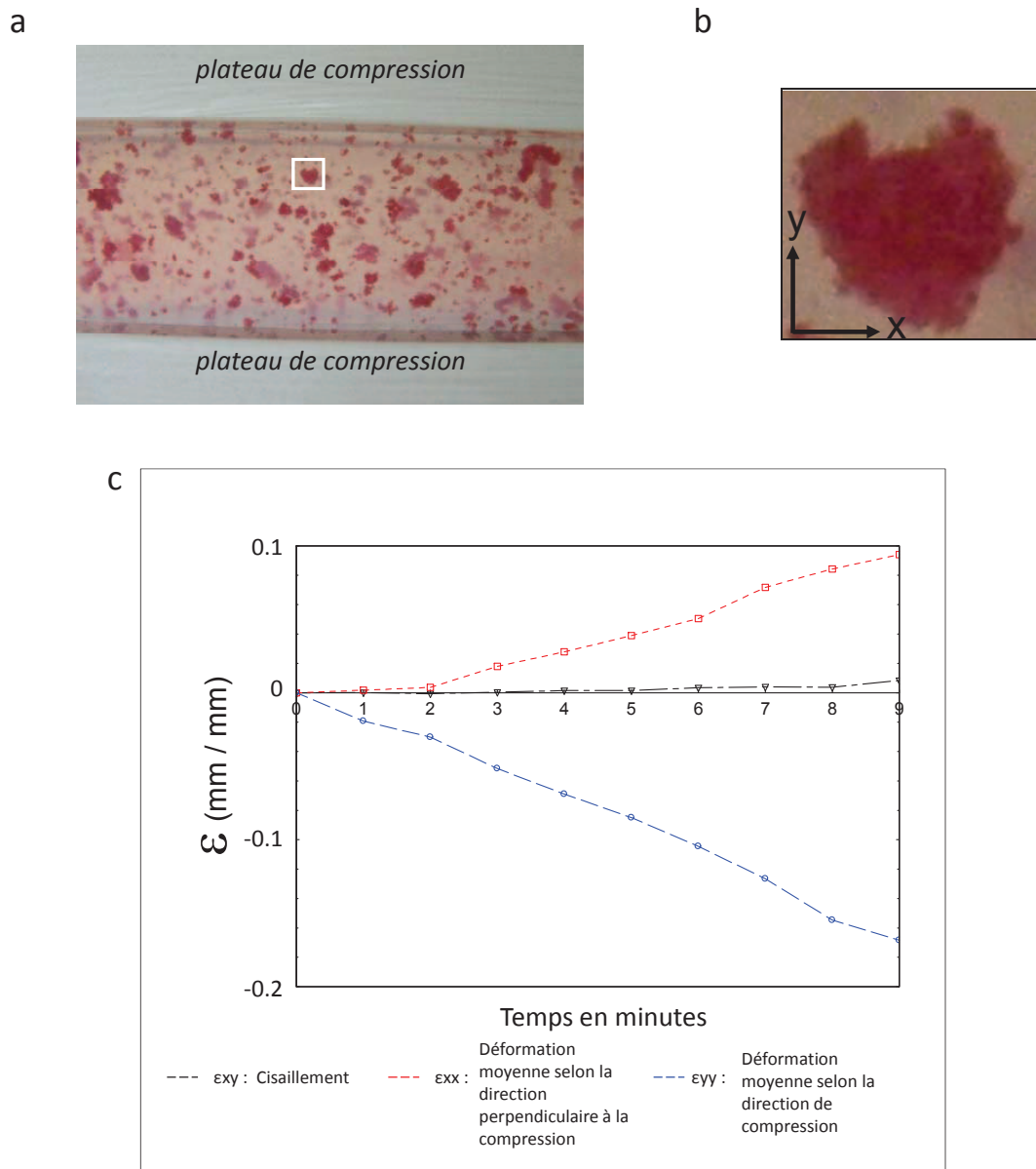
## 7. Analyses d'expression par RT-PCR quantitative en temps réel

Les amplifications par PCR quantitative en temps réel (qPCR) ont été réalisées en utilisant l'iCycler IQ de chez Biorad et le SYBR green comme fluorophore. Chaque réaction qPCR (25 µL) contenait : des ADNc (4 µL d'une dilution 1:40 du produit de RT), de MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay (Eurogentec, Angers, France) (1X) et les amorces (200 nM de chaque). Après une étape de chauffage à 94°C pendant 3 minutes, les conditions de cycles de PCR étaient de 40 cycles de dénaturation (94°C, 15 s)/hybridation des amorces (60°C pour les amorces *PtaZFP2*, *GUS* ou *EF1α*, 15s)/élongation (72°C, 20 s) et terminées par une étape d'élongation à 72°C pendant 5 min. Les transcrits du gène *PtaZFP2* ont été amplifiés en utilisant les amorces PE1-S 5'-CGTGCGAGTCACAAGAAACC-3' et PE1-AS 5'-CACAGAACTCTCTTGCTGCT-3' (287 pb amplifiées) et ceux du gène *GUS* en utilisant les amorces GUS-S 5'-CTGATAGCGCGTGACAAAAA-3' et GUS-AS 5'-GGCACAGCACATCAAAGAGA-3' (208 pb amplifiées). Les transcrits du gène de référence *EF1α* (*Facteur d'Elongation 1α*) ont été amplifiés en utilisant les amorces EF1-S 5'-GACAACTAGGTACTACTACTGCACTGTC-3' et EF1-AS 5'-TTGGTGGACCTCTCGATCATG-3' (378 pb amplifiées). La quantité relative des transcrits ( $Q_r$ ) de chaque gène a été calculée par comparaison avec l'expression du gène *EF1α* en utilisant la méthode de delta-delta (McMaugh and Lyon, 2003) :

$$Q_r = 2^{(C_{\text{témoin}} - C_{\text{traité}})_{\text{gène étudié}} / 2^{(C_{\text{témoin}} - C_{\text{traité}})_{\text{gène de référence}}}}$$

où C est le nombre de cycle seuil de PCR. La spécificité de l'amplification a été vérifiée en déterminant les courbes de fusion de chaque produit PCR à la fin de chaque expérience. Les amplifications qPCR ont été réalisées au moins dans deux expérimentations indépendantes pour lesquelles chaque échantillon a été testé en triplicata. Les différents groupes statistiques ont été obtenus grâce au test HSD (Honestly Significantly Different) de Tukey.





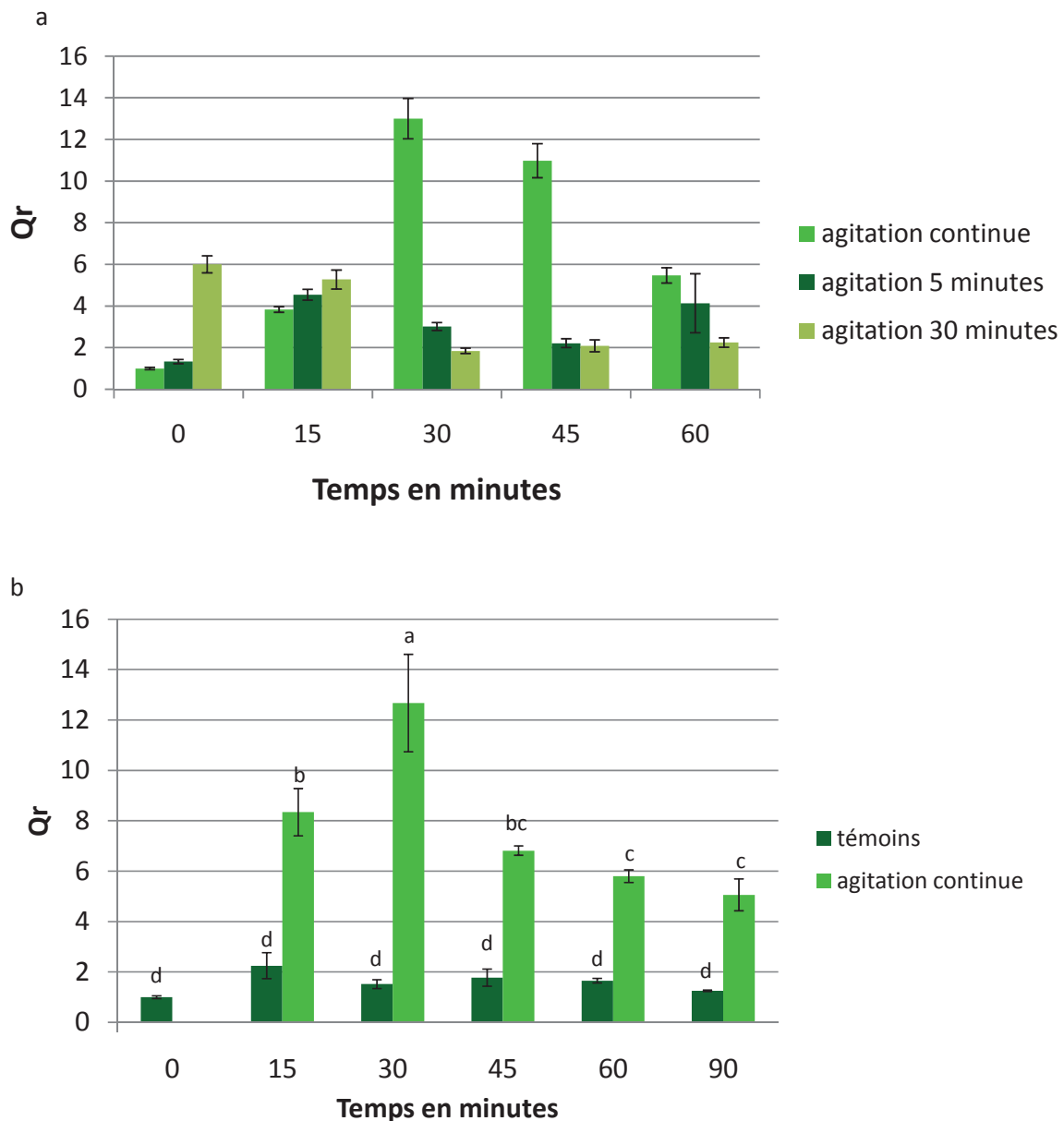
**Figure 31 : Etude des déformations subies par un cluster de cellules au cours d'une compression réalisée avec l'Instron.** Image brute de la face latérale du gel au premier niveau de compression (a), exemple de cluster isolé dont les paramètres de déformation sont évalués (image avant déformation, b) et courbe temps-déformation d'un cluster de cellules isolé (c). L'algorithme de corrélation d'images permet d'accéder à la déformation moyenne du cluster selon la direction de compression ( $\epsilon_{yy}$ ), la direction perpendiculaire à la compression ( $\epsilon_{xx}$ ) et au cisaillement ( $\epsilon_{xy}$ ).  $\epsilon_{yy}$  et  $\epsilon_{xx}$  permettent d'évaluer le coefficient de Poisson ( $=\epsilon_{xx}/\epsilon_{yy}$ ).

## C. Résultats

### 1. Application d'une sollicitation mécanique sur des cellules de peuplier

Dans le but de valider le modèle de mécanoperception au niveau cellulaire, des cellules de peuplier (*Populus tremula x alba*) ont été incluses dans un gel à 3% d'agarose. Les cellules sont colorées au rouge neutre afin de pouvoir les visualiser. Le gel a alors été soumis à une compression contrôlée grâce à l'Instron. Cet appareil permet de contrôler précisément la force appliquée ainsi que la vitesse et la durée d'application. Il est alors possible d'établir une loi de réponse reliant la sollicitation mécanique imposée à l'expression de *PtaZFP2*.

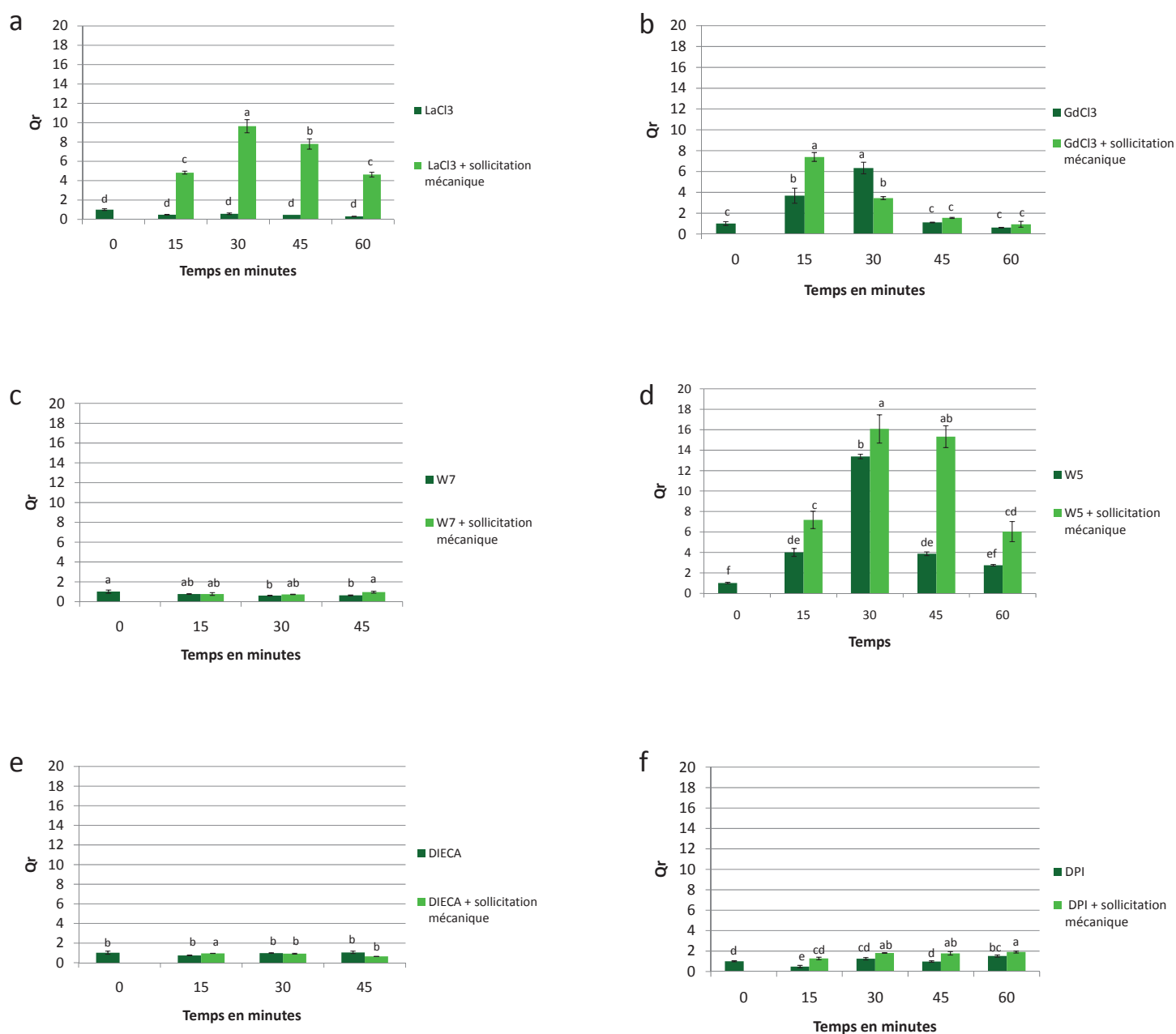
Nous avons dans un premier temps déterminé les conditions optimales de compression. En effet des compressions trop importantes ou trop brusques du gel amènent à la rupture de ce dernier (données non présentées). Finalement, nous avons appliqué des compressions de 25% à une vitesse de  $1\%.\text{min}^{-1}$ . La compression a été suivie par une prise d'image toutes les minutes. Les images ont pu être utilisées afin d'évaluer la déformation réellement subie par les cellules. La transparence du gel d'agarose a permis d'isoler des clusters de cellules sur les images (Figure 31a et b). Pour chaque cluster, nous avons appliqué un algorithme basé sur la différence de distribution des niveaux de gris entre deux images et permettant d'évaluer la déformation de la région d'intérêt (Badel and Perré, 2001). Ceci nous a permis d'extraire la déformation réelle moyenne du cluster dans la direction de compression ( $\varepsilon_{yy}$ ) et dans la direction perpendiculaire à cette compression ( $\varepsilon_{xx}$ ). La comparaison de chacune des images réalisées au cours du test avec la première image (échantillon au repos) permet ensuite de tracer les courbes des déformations au cours du temps. On peut alors estimer (Figure 31c) la déformation verticale liée à l'effet de compression, la déformation horizontale liée à l'effet de Poisson et la déformation liée au cisaillement ( $\varepsilon_{xy}$ ). Le cisaillement représente le glissement des sections les unes par rapport aux autres et pourrait être assimilé à la variation de l'angle formé par les axes  $xx$  et  $yy$ . Comme le montre la Figure 31c, nous pouvons observer que dans ces conditions le cisaillement est quasiment nul. Le coefficient de Poisson permet de caractériser la déformation de la matière perpendiculairement à la direction de l'effort appliqué. Dans nos conditions, la valeur du



**Figure 32 : Cinétique d'accumulation des ARNm de *PtaZFP2* dans des cellules de peuplier en réponse à une sollicitation mécanique** (agitation, 325 rpm). Les ARNs totaux ont été extraits à différents temps (0, 15, 30, 45 et 60 minutes) au cours des différents traitements : soit l'agitation rapide des cellules est maintenue tout au long de la cinétique de prélèvements, soit les cellules subissent une agitation rapide pendant 5 ou 30 minutes puis la cinétique de prélèvements est réalisée alors que l'agitation des cellules est ramenée aux conditions initiales (120 rpm) (a). Dans le cadre d'une agitation rapide continue des cellules, les ARNs totaux ont été extraits à différents temps (0, 15, 30, 45, 60 et 90 minutes) au cours de la sollicitation mécanique (b). L'accumulation relative de transcrits (Qr) a été déterminée par PCR quantitative en temps réel et correspond à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes  $\pm$  SE.

coefficient de Poisson est de 0,48 ( $\epsilon_{xx}/\epsilon_{yy}$  ;  $\epsilon_{xx} = 0,0496$  et  $\epsilon_{yy} = 0,1036$ ) à 6 minutes de compression (fin de zone linéaire). Cependant, les valeurs de  $xx$  et  $yy$  étant faibles et difficiles à mesurer précisément, ce coefficient de Poisson ne peut être qu'une estimation. Si cette méthode de sollicitation mécanique semble intéressante par le fait que l'on maîtrise totalement la force appliquée et que l'on peut quantifier la déformation perçue par les cellules, il faut pouvoir quantifier la réponse des cellules suite à ces déformations. Pour cela, nous avons cherché à étudier l'expression de *PtaZFP2* par les cellules dans ces conditions de sollicitation mécanique. Toutefois, malgré différentes mises au point de la technique d'extraction d'ARNs, nous n'avons pas réussi à extraire les ARNs des cellules prises dans le gel d'agarose de manière reproductible et en quantité suffisante. Nous ne pouvons donc pas étudier l'expression de *PtaZFP2* avec ce système de sollicitation mécanique.

Nous avons alors tenté d'imposer une sollicitation mécanique aux cellules de peuplier en augmentant la vitesse d'agitation rotative des cultures cellulaires de 120 à 325 rpm. Une cinétique de prélèvement au cours d'un tel stress mécanique a été réalisée (0, 15, 30, 45 ou 60 minutes) et l'expression de *PtaZFP2* a été testée par qPCR. Dans un premier temps, nous avons testé plusieurs cinétiques de sollicitation/prélèvement : soit l'agitation rapide des cellules (325 rpm) est maintenue tout au long de la cinétique de prélèvement, soit l'agitation rapide a été appliquée aux cellules pendant 5 ou 30 minutes et la cinétique de prélèvement a ensuite été réalisée alors que les cellules sont de nouveau agitées à 120 rpm. La Figure 32a montre que, bien que toutes les conditions de sollicitation amènent à une induction de l'expression de *PtaZFP2*. Lorsque l'augmentation de l'agitation est maintenue pendant un temps court (5 minutes), l'induction de l'expression est faible et peu reproductible d'une expérience à l'autre. Lorsque les cellules ont subi 30 minutes d'agitation rapide, l'induction de l'expression de *PtaZFP2* est plus forte mais débute avant que commence la cinétique de prélèvement. Par contre, lorsque les prélèvements sont réalisés au cours de la sollicitation, l'accumulation des transcrits de *PtaZFP2* est plus importante. De plus, nous avons constaté que ce protocole d'expérimentation amenait à des résultats plus reproductibles. Nous avons donc choisi d'utiliser une sollicitation continue par une agitation rotative à 325 rpm des cultures cellulaires pour la suite des expériences. Ainsi, au cours d'une telle sollicitation mécanique, une accumulation significativement plus importante des transcrits de *PtaZFP2* est observée par rapport aux cellules en condition témoin (Figure 32b). Cette induction de

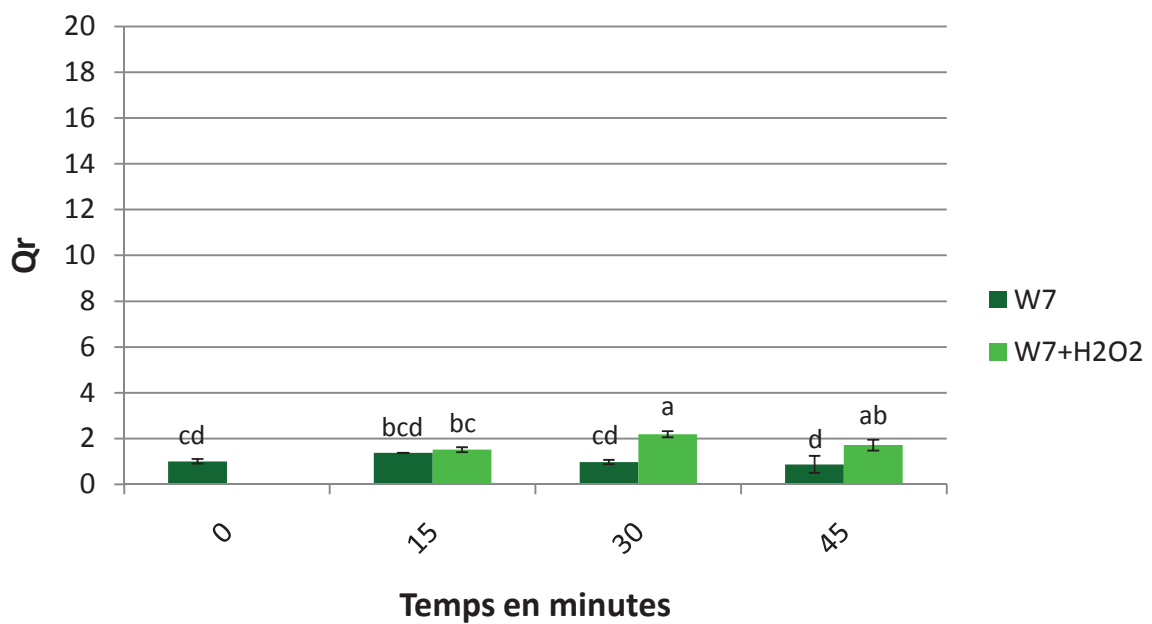


**Figure 33 : Cinétique d'accumulation des ARNm de *PtaZFP2* dans des cellules de peuplier en réponse à différents inhibiteurs et à une sollicitation mécanique (agitation, 325 rpm).** Les cellules ont été pré-traitées pendant 1h en présence de différents inhibiteurs : LaCl<sub>3</sub> (chlorure de lanthane, inhibiteur des canaux calciques, 0,5 mM, a), GdCl<sub>3</sub> (chlorure de gadolinium, inhibiteur des canaux calciques mécanosensibles, 0,5 mM, b), W7 (antagoniste des calmodulines, 200 µM, c), W5 (analogue du W7 mais faiblement antagoniste des calmodulines = témoin négatif du W7, 200µM, d), DIECA (inhibiteur de la voie des jasmonates, 1,5 mM, e) ou du DPI (inhibiteur de la production d'EAO par la NADPH-oxydase, 100 µM, f). Les ARNs totaux ont été extraits à différents temps (0, 15, 30, 45 et 60 minutes) au cours de la sollicitation mécanique. L'accumulation relative de transcrits (Qr) a été déterminée par PCR quantitative en temps réel et correspond à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes ± SE.

l'expression du gène *PtaZFP2* en réponse à la sollicitation mécanique est rapide, dès 15 minutes, et transitoire. Le maximum d'induction est observé au temps de prélèvement 30 minutes. Cette cinétique d'induction est donc semblable à celle observée en réponse à la flexion de la tige (Martin *et al.*, 2009). Bien que non quantifiable au niveau mécanique (la déformation réellement subie par la cellule ne peut être mesurée), l'agitation des cultures cellulaires peut donc être une méthode utilisée afin de solliciter mécaniquement les cellules.

## 2. Régulation de l'expression de *PtaZFP2* au cours de la sollicitation mécanique

Dans le premier chapitre de la thèse, nous avons mis en évidence des molécules capables de réguler l'expression de *PtaZFP2* (le calcium, les jasmonates et l' $H_2O_2$ ) et nous venons de mettre au point une technique simple de sollicitation mécanique des cellules de peuplier. Puisque le gène *PtaZFP2* peut être régulé par d'autres contraintes (froid, stress salin, blessure...), nous avons voulu savoir si ces molécules capables d'induire l'expression de *PtaZFP2* étaient réellement impliquées dans la réponse du gène au stress mécanique. Nous avons donc testé l'effet d'inhibiteurs de certaines voies sur la réponse au stress mécanique. Pour cela, les cellules ont été pré-incubées 1h avec différents inhibiteurs :  $LaCl_3$  (chlorure de lanthane, inhibiteur des canaux calciques membranaires, 0,5 mM),  $GdCl_3$  (chlorure de gadolinium, inhibiteur des canaux calciques mécanosensibles, 1 mM), W7 (antagoniste des calmodulines, 200  $\mu M$ ), W5 (analogue structural du W7 ne présentant pas la propriété d'antagoniste des calmodulines, 200  $\mu M$ ), DIECA (inhibiteur de la voie des jasmonates par réduction de l'acide 13(S)-hydroperoxylinolénique (HPOTrE) en acide 13-hydroxylinolénique (HOTrE), 1,5 mM) ou DPI (inhibiteur de la NADPH oxydase, enzyme de la voie de production des EAO, 100  $\mu M$ ). Les cellules ont ensuite été soumises ou non à une sollicitation mécanique (agitation 325 rpm) puis une cinétique d'accumulation des transcrits de *PtaZFP2* a été réalisée. Comme le montre la Figure 33a, le  $LaCl_3$  ne modifie pas l'expression de *PtaZFP2* en absence ou en présence d'une sollicitation mécanique. En revanche, une induction significative de l'expression de *PtaZFP2* est observée en présence de  $GdCl_3$  et ceci



**Figure 34 : Cinétique d'accumulation des ARNm de *PtaZFP2* dans des cellules de peuplier en réponse au W7 et à un traitement  $H_2O_2$ .** Les cellules ont été pré-traitées pendant 1h en présence de W7 (antagoniste des calmodulines, 200  $\mu M$ ) et soumises à un traitement  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ ) ou non. Les ARNs totaux ont été extraits à différents temps (0, 15, 30, 45 et 60 minutes) après l'application de  $H_2O_2$ . L'accumulation relative de transcrits (Qr) a été déterminée par PCR quantitative en temps réel et correspond à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes  $\pm$  SE.

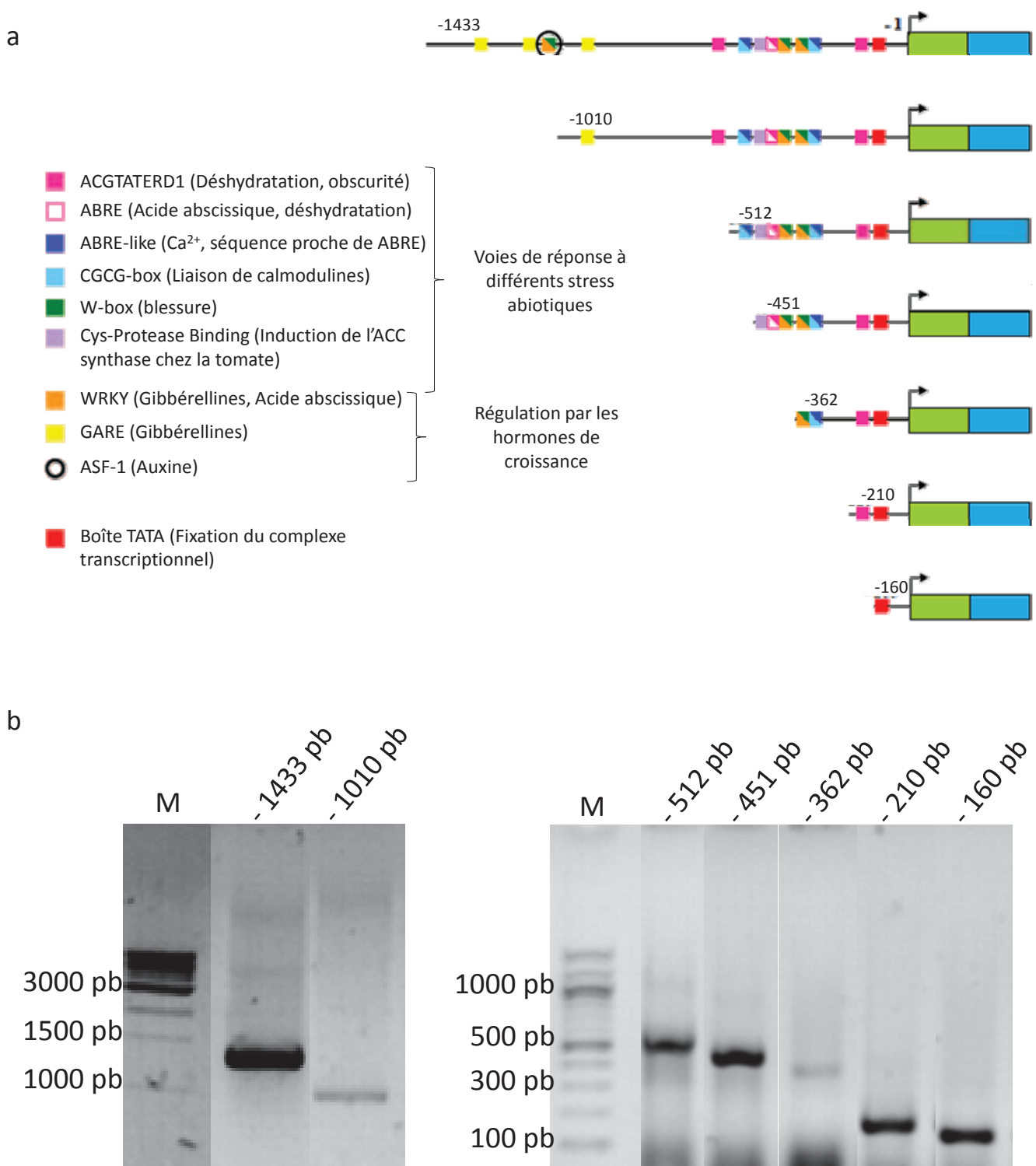
dès 15 minutes après le traitement. Le niveau d'expression du gène diminue et revient à un niveau de base après 45 minutes de traitement (Figure 33b). Par contre, le  $\text{GdCl}_3$  n'a pas d'effet sur l'accumulation de transcrits de *PtaZFP2* en réponse à la sollicitation mécanique ni sur sa cinétique d'induction. Le W7 et le W5 sont des analogues structuraux mais seul le W7 est un antagoniste des calmodulines. Comme le montre la Figure 33c, un traitement des cellules avec le W7 n'induit pas l'expression du gène *PtaZFP2*. Par contre, en présence de W7, aucune accumulation des transcrits n'est constatée au cours d'une sollicitation mécanique (Figure 33c). Au cours du traitement W5, on observe une accumulation des transcrits de *PtaZFP2* avec ou sans sollicitation mécanique : dans les deux cas, l'expression du gène est fortement induite dès 15 minutes de traitement, est maximale à 30 minutes puis diminue fortement pour le W5 seul, moins fortement pour les cellules soumises à une sollicitation mécanique (Figure 33d). Le traitement des cellules par du DIECA n'a pas d'effet sur l'expression du gène (Figure 33e). Par contre, cet inhibiteur de la voie des jasmonates, inhibe l'expression de *PtaZFP2* en réponse à la sollicitation mécanique. De la même façon, le DPI (inhibiteur de la NADPH oxydase) n'induit pas l'expression de *PtaZFP2* seul et inhibe l'induction de ce dernier par la sollicitation mécanique (Figure 33f).

Finalement, afin de tester une interaction potentielle entre ces différentes molécules dans la cascade de réponse, nous avons testé l'effet du W7 (antagoniste des calmodulines) sur des cellules soumises à un traitement  $\text{H}_2\text{O}_2$  (500 $\mu\text{M}$ ). Nous avons effectivement montré, dans le premier chapitre, que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  était capable de réguler l'expression de *PtaZFP2*. Comme le montre la Figure 34, les cellules soumises à un traitement  $\text{H}_2\text{O}_2$  et ayant été pré-traitées avec le W7 ne présentent pas d'augmentation de l'accumulation des transcrits de *PtaZFP2* (Figure 34), contrairement à un traitement  $\text{H}_2\text{O}_2$  seul (cf. Figure 6b, chapitre 1).

### *3. Délétions du promoteur de PtaZFP2 et effet sur la réponse à la sollicitation mécanique*

Puisque le promoteur est la zone importante dans la régulation de l'expression d'un gène, nous avons voulu retrouver les régions du promoteur nécessaires à l'expression de *PtaZFP2*





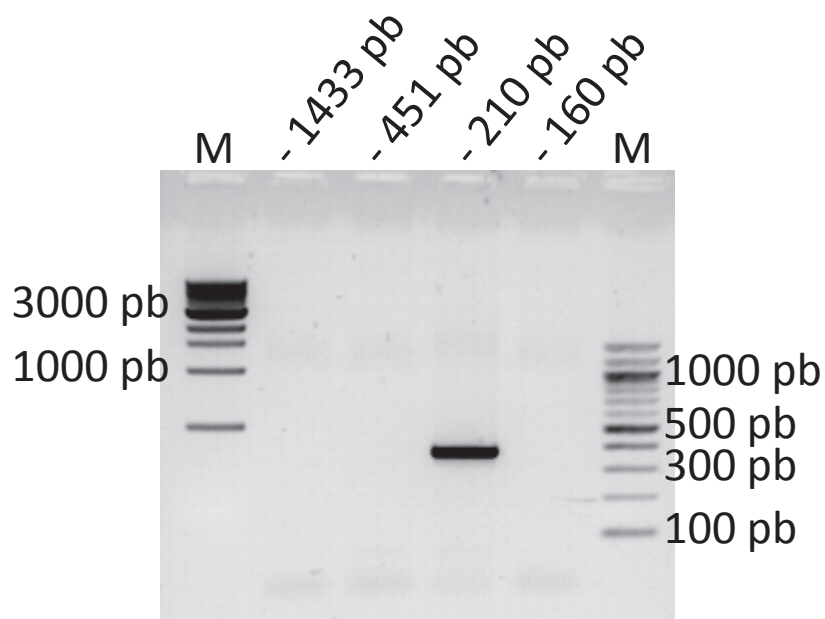
**Figure 35 : Représentation schématique du promoteur et des différentes constructions utilisées pour l'étude des régions régulatrices du promoteur du gène *PtaZFP2* (a).** Certains éléments de régulation pertinents prédits par le programme PLACE et la boîte TATA sont indiqués. Le promoteur entier ou délété à différents niveaux est placé en amont des gènes rapporteurs de la *GFP* (Green Fluorescence Protein, vert) et *GUS*. (glucuronidase, bleu). Les chiffres font référence à la position par rapport au codon ATG(+1). La présence de ces constructions a été vérifiée par PCR réalisées sur les *Agrobacterium* transformées (b). Des *Agrobacterium* C58 ont été transformées avec le vecteur pGKWS7.0 contenant le promoteur entier ou délété de *PtaZFP2* placé en amont des gènes *GFP* et *GUS*. Les amorces sens spécifiques de chaque construction (Figure 29b) et l'amorce Reverse 5'-GGTAATTAAGCTTACAGGTTAGAT-3' ont été utilisées. Les tailles attendues des différentes constructions sont indiquées au dessus de chaque piste. M : marqueur de taille.

dans la réponse au stress mécanique. Pour cela, nous avons placé le promoteur plus ou moins délété en amont de gènes rapporteurs *GFP* et *GUS* (Figure 29a) et nous avons transformé des souches d'*Agrobacterium* avec ces différentes constructions. Comme le montre la Figure 35a, les différentes constructions sont progressivement délétées pour des éléments *cis* régulateurs d'intérêt : des boîtes de réponses aux gibbérellines, à l'obscurité ou la déshydratation, au calcium et aux calmodulines, aux hormones (éthylène, gibbérellines, ABA) ou à la blessure sont supprimées et la dernière construction ne possède plus que la boîte TATA (fixation du complexe transcriptionnel).

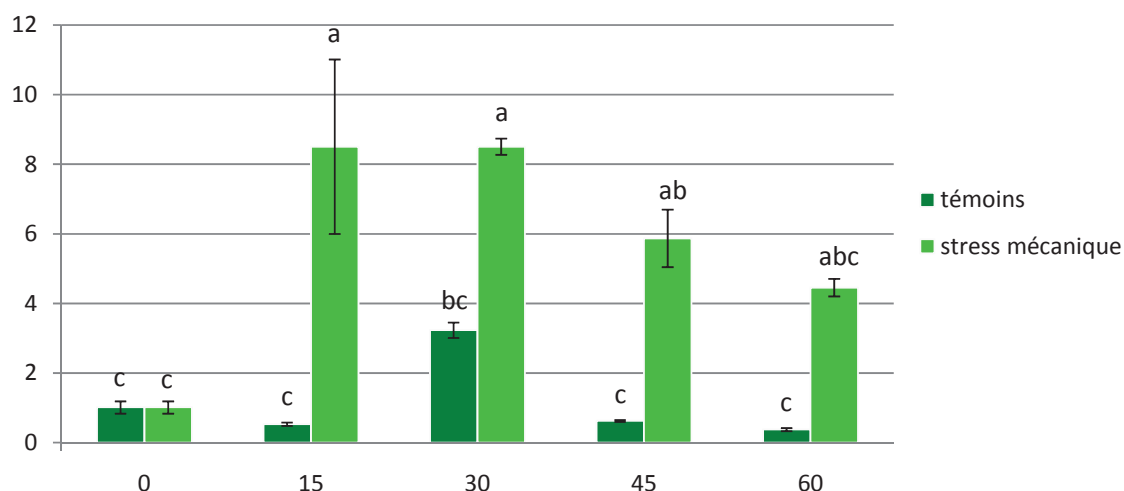
Nous possédons 7 souches d'*Agrobacterium* transformées avec les 7 délétions successives du promoteur de *PtaZFP2* : -1433 pb, -1010 pb, -512 pb, -451 pb, -362 pb, -210 pb et -160 pb (Figure 35b). Des entre-nœuds de peupliers ont ensuite été transformés génétiquement grâce à ces souches d'*Agrobacterium*. Nous avons ainsi obtenu 4 lignées de cals transformés (-1433 pb, -451 pb, -210 pb et -152 pb) qui contenaient toutes le transgène (vérification PCR). Après plusieurs cycles de repiquage, les cals ont pu être utilisés pour l'initiation de cultures cellulaires. Nous avons voulu vérifier si les cellules utilisées contenaient toujours le transgène. Nous avons donc effectué une extraction d'ADN et une PCR avec les amorces pKGWFS7.0 situées de part et d'autre de l'insert (Figure 36). Les résultats montrent que seules les cultures cellulaires transformées avec le promoteur délété -210 pb contiennent le transgène et ont pu être utilisées pour la suite des expérimentations. Malgré le maintien de l'antibiotique dans le milieu de culture pendant plusieurs repiquages, certaines cellules non transformées se sont multipliées, expliquant l'absence de transgène dans les trois autres lignées cellulaires.

Un stress mécanique (agitation à 325 rpm) a été appliqué sur les cultures cellulaires transgéniques contenant le promoteur délété (-210 pb). Les accumulations de transcrits du gène *PtaZFP2* endogène et du gène rapporteur *GUS* ont été suivies en parallèle par qPCR. L'endogène *PtaZFP2* est bien induit, témoignant que les cellules ont bien perçu la sollicitation mécanique appliquée ; en revanche l'expression du transgène *GUS* n'est pas induite (Figure 37).

Dans le premier chapitre, nous avons identifié des molécules capables d'induire l'expression de *PtaZFP2* : calcium, éthéphon, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cycloheximide. Nous avons donc testé l'effet de ces molécules sur les cellules transformées délétées pour la majeure partie du

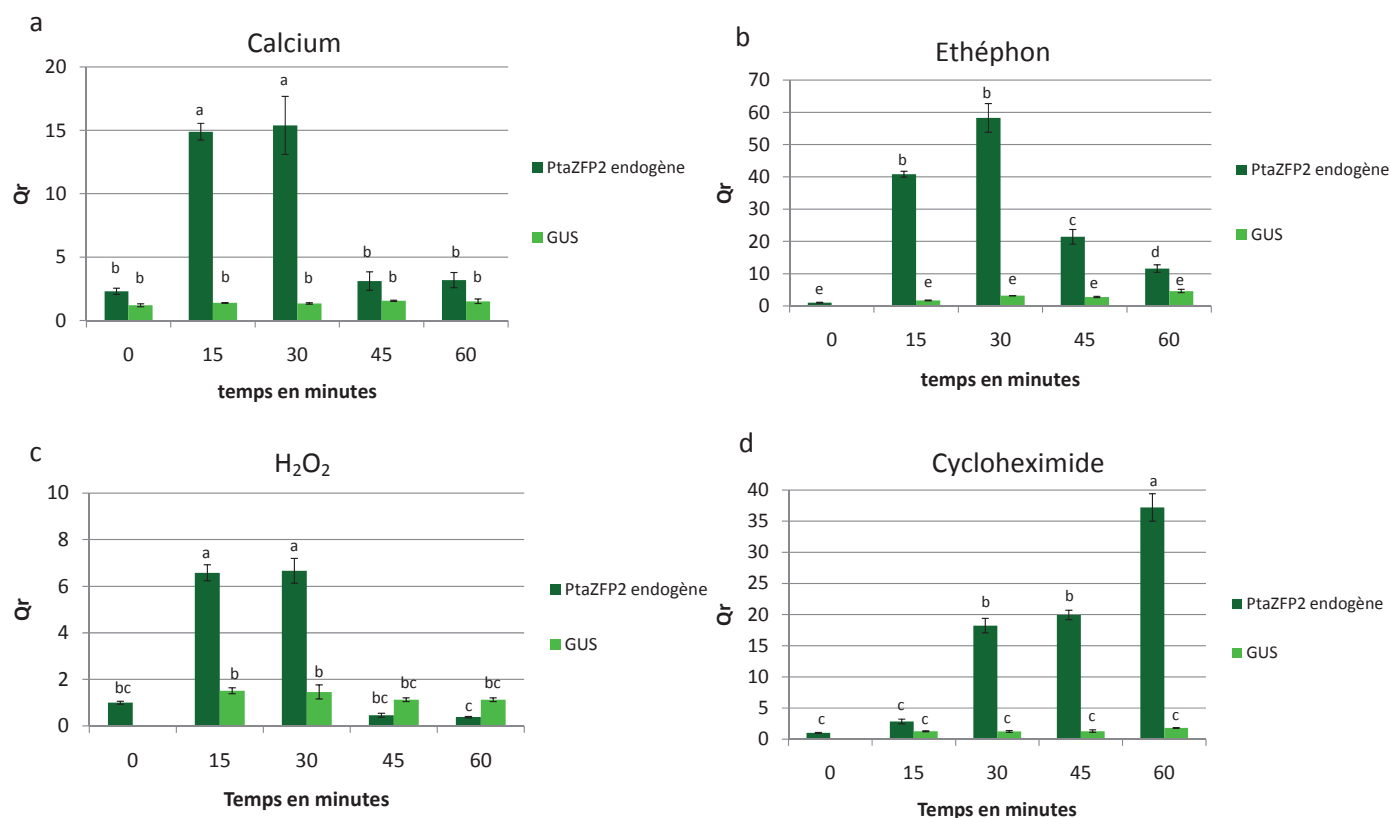


**Figure 36 : PCR réalisées à partir d'ADN génomique extraits sur des cellules transgéniques de peuplier (*Populus tremula x alba*).** Des cellules de peuplier ont été transformées génétiquement avec le promoteur entier ou délété de *PtaZFP2* placé en amont des gènes *GFP* et *GUS*. Les amorces pKGWF7 sens 5'-TCCCATATGGTCGACCTGCA-3' et anti-sens 5'-TCCTCGCCCTTGCTCACCAT-3', situées respectivement en amont et en aval des sites attR1 et attR2 d'insertion du promoteur ont été utilisées. Les tailles attendues des différentes constructions (auxquelles il faut ajouter les sites AttR1 et AttR2 soit environ 250 pb) sont indiquées au dessus de chaque piste. M : marqueur de taille.



**Figure 37 : Cinétique d'accumulation des ARNm de *PtaZFP2* endogène et des ARNm de *GUS* en réponse à une sollicitation mécanique (agitation, 325 rpm) sur des cellules transgéniques *PtaZFP2-210::GUS-GFP*.** Des cultures cellulaires transformées contenant le promoteur de *PtaZFP2* délété (-210 pb) ont été soumises à une sollicitation mécanique (agitation 325 rpm) et l'accumulation des transcrits de l'endogène *PtaZFP2* et du transgène *GUS* sous contrôle de 210 pb du promoteur de *PtaZFP2* ont été suivies. Les ARNs totaux ont été extraits à différents temps (0, 15, 30, 45, 60 et 90 minutes) au cours de la sollicitation mécanique. L'accumulation relative de transcrits (Qr) a été déterminée par PCR quantitative en temps réel et correspond à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes  $\pm$  SE.

promoteur. Si l'induction de l'expression du gène *PtaZFP2* endogène est bien observée pour chaque condition (preuve que le traitement a été efficace), nous n'observons aucune accumulation de transcrits du gène rapporteur *GUS* par le calcium, l'éthéphon, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  ou la cycloheximide (Figure 38).



**Figure 38 : Cinétique d'accumulation des ARNm de *PtaZFP2* et des ARNm de *GUS* en réponse à des traitements au calcium sur des cellules transgéniques *PtaZFP2-210::GUS-GFP*.** Des cultures cellulaires transformées contenant le promoteur de *PtaZFP2* délété (-210 pb) ont été soumises à un traitement calcium (10 mM, a), éthéphon (1 mM, b), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 µM, c) ou cycloheximide (50 µM, d) et les expressions de l'endogène *PtaZFP2* et du transgène *GUS* ont été suivies. Les ARNs totaux ont été extraits à différents temps (0, 15, 30, 45 et 60 minutes) après le traitement. L'accumulation relative de transcrits (Qr) a été déterminée par PCR quantitative en temps réel et correspond à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes ± SE.

## D. Discussion

Le but de l'étude était de pouvoir appliquer une sollicitation mécanique sur des cellules de peuplier afin de (1) vérifier le modèle biomécanique de mécanoperception ( $S^3m$ ) à l'échelle cellulaire, (2) étudier la régulation du gène *PtaZFP2* au cours de la réponse au stress mécanique et (3) définir les régions importantes de son promoteur dans la régulation de l'expression de ce gène.

85

### 1. Application d'une sollicitation mécanique quantifiable au niveau cellulaire

La première idée était d'inclure les cellules de peuplier dans un gel d'agarose sur lequel on réalisait une compression contrôlée. Cette technique permettait d'une part de contrôler parfaitement la sollicitation mécanique appliquée grâce à l'Instron (force, vitesse, durée), et d'autre part de pouvoir suivre la déformation réellement subie par les cellules à l'intérieur du gel grâce à une analyse d'images. Il a été montré que la variable physique mécanoperçue par la plante est la somme des déformations longitudinales le long de la zone fléchie (Coutand and Moulia, 2000) et au niveau plante entière, une corrélation positive entre la somme des déformations appliquée au cours d'une flexion de la tige et l'expression de *PtaZFP2* a été retrouvée (Martin *et al.*, 2009). Il aurait donc été intéressant de pouvoir établir une loi de réponse similaire au niveau cellulaire. Cette technique d'inclusion de cellules dans un gel d'agarose a déjà été utilisée afin de tester l'effet d'un stress mécanique sur des cellules de chrysanthème (Zhou *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Dans ces études, Zhou et ses collaborateurs ont montré que les cellules orientent leur élongation dans la direction perpendiculaire à la force de compression appliquée. Leurs observations ont été réalisées jusqu'à une semaine après l'application de la sollicitation témoignant que les cellules incluses dans le gel d'agarose sont bien capables de percevoir la compression appliquée, mais surtout que leur survie, leur division et leur élongation ne sont pas affectées par l'inclusion dans le gel. Dans cette expérience, les auteurs ont estimé les « contraintes



mécaniques » par modélisation et ont montré une corrélation dose-dépendante entre la réponse observée et le stress appliqué. Toutefois les études de Zhou et ses collaborateurs se limitent à des observations microscopiques et aucune analyse moléculaire n'a été réalisée. Ici, nous avons rencontré le problème de l'extraction d'ARNs. La quantité relative cellules/gel d'agarose et probablement la nature du gel lui-même gênent énormément l'extraction et nous n'avons pas été capables d'extraire des ARNs en quantité suffisante pour une analyse moléculaire.

Puisque les analyses moléculaires sont compromises mais que l'analyse de la déformation est possible, il faudrait trouver le moyen de quantifier la réponse des cellules. L'utilisation de constructions comme celles que nous possédons, avec le promoteur de *PtaZFP2* en amont de gènes rapporteurs, pourrait être une solution. Ainsi la réponse à la sollicitation mécanique pourrait être suivie visuellement *via* l'expression de la *GFP*. Toutefois, il faudrait alors être capable de quantifier précisément l'intensité du signal GFP observé afin de le corréler avec l'intensité de la compression appliquée : ceci demande encore des mises au point méthodologiques. D'autres techniques de sollicitation mécanique des cellules sont utilisées en particulier sur des cellules animales. Des cellules ostéoblastiques ont par exemple été plaquées contre une membrane de silicone et la membrane a ensuite été déformée (Katsuya *et al.*, 2005). On peut ainsi contrôler précisément la déformation appliquée à la membrane de silicone et extraire les ARNs correspondants sans la gêne du gel d'agarose. Dans leur étude, les auteurs utilisaient un marquage fluorescent de l'actine pour mesurer la réponse de la cellule.

Pour des raisons techniques et de temps, nous avons cherché une autre manière plus simple de solliciter mécaniquement les cellules. Haley et ses collaborateurs expliquent que beaucoup d'organismes unicellulaires répondent à une simple agitation comme sollicitation mécanique. Des cultures cellulaires d'*Arabidopsis* transformées à l'*aequorine* montrent une luminescence en réponse à l'agitation (Braam, communication personnelle dans Haley *et al.*, 1995). L'agitation rotative de cultures cellulaires (300 rpm) a d'ailleurs été utilisée comme stress physique (cisaillement) sur des cellules de peuplier et l'expression de certains gènes en réponse à cette sollicitation a été étudiée (Lee *et al.*, 2005). Dans notre étude, l'augmentation de la vitesse d'agitation des cultures cellulaires (de 120 rpm à 325 rpm), entraîne une induction de l'expression de *PtaZFP2* avec une cinétique d'induction





comparable à celle observée en réponse à la flexion de la tige. Cette technique ne permet pas de mesurer la déformation subie par les cellules au cours de la sollicitation. La cellule est pourtant soumise, au cours de l'agitation rotative, à des forces d'accélération et de décélération qui doivent amener à des déformations de la cellule et donc de sa membrane (variable perçue par la cellule d'après le modèle  $S^3m$ ). On pourrait imaginer suivre l'agitation des cellules par capture d'images (caméra placée au dessus de l'erlen de culture cellulaire) et tenter d'estimer les fréquences auxquelles sont soumises les cellules. Au cours d'une étude portant sur l'effet de l'agitation rotative sur la différenciation des cellules souches embryonnaires, les forces de cisaillement générées par des agitations rotatives à différentes vitesses ont été modélisées. Ces forces de cisaillement ne semblent pas être réparties uniformément et se concentrent à l'extérieur de la culture (Sargent *et al.*, 2010). Ce déplacement des forces vers l'extérieur est sûrement imputable à la force centrifuge. De plus, le stress mécanique perçu par la cellule au cours de l'agitation pourrait être de nature interne *via* le déplacement de statolithes à l'intérieur de la cellule et qui pourraient être déplacés grâce à cette force centrifuge. Les statolithes sont en effet des organites (amyloplast de grande taille) impliqués dans la perception de la gravité par la cellule (Telewski, 2006; Perbal, 2009). Ces statolithes seraient reliés au cytosquelette et feraient donc partie intégrante du continuum CPMCW, permettant la perception et la transduction du signal mécanique. Dans le but d'étayer cette hypothèse, nous avons vérifié que les cellules utilisées contenaient bien des amyloplast grâce à une coloration au lugol : nous avons ainsi pu constater la présence de nombreux amyloplast de taille raisonnable dans ces cellules ; il reste à démontrer que ces amyloplast pourraient jouer le rôle de statolithes dans ces cellules.

Même si aucune corrélation déformation/expression n'a pu être établie au cours de cette étude, nous pourrions à l'avenir étudier l'impact d'une gamme d'agitations plus ou moins importante pour tester les relations entre la fréquence d'agitation des cellules et l'induction de l'expression de *PtaZFP2*.



## 2. Régulation de l'expression de *PtaZFP2* au cours de la sollicitation

### *mécanique*

Dans le premier chapitre nous avons identifié des molécules capables de réguler l'expression de *PtaZFP2* : calcium, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, jasmonates. Afin de tester le rôle de ces molécules dans la réponse de *PtaZFP2* au stress mécanique, nous avons traité les cultures cellulaires avec des inhibiteurs des voies de ces différentes molécules, puis nous avons soumis les cultures cellulaires à une sollicitation mécanique (agitation).

Le W7, antagoniste des calmodulines, inhibe l'induction de l'expression de *PtaZFP2* par le stress mécanique. Les calmodulines sont impliquées dans la perception et la transduction du signal calcique : leur conformation et/ou leur activité catalytique change lorsqu'elles se lient au calcium (White et Broadley, 2003). L'analyse globale du génome d'*Arabidopsis thaliana* de Lee et ses collaborateurs (2005) montre que 3% des gènes sur-exprimés 30 minutes après le toucher codent des calmodulines. Une accumulation de transcrits d'un gène codant une calmoduline a été observée en réponse au frottement chez la tomate et ceci dès 30 minutes après la sollicitation avec un pic d'expression au bout de 2 heures (Depège *et al.*, 1997). De la même façon, une accumulation de transcrits des gènes *TOUCH* (*TCH1* à *3*), codant également des calmodulines, a été observée en réponse au toucher chez *Arabidopsis thaliana* dès 10 à 30 minutes après la sollicitation (Braam and Davis, 1990; Sistrunk *et al.*, 1994). Des transcrits de l'homologue de *TCH2* chez le peuplier s'accumulent en réponse à la flexion de la tige, et ceci avec une cinétique comparable à celle de *PtaZFP2* (Martin *et al.*, 2009). Les calmodulines semblent donc jouer un rôle dans la cascade de réponse au stress mécanique impliquant *PtaZFP2* et interviendraient, d'après nos résultats, en amont de celui-ci. Nous avons observé une induction de l'expression de *PtaZFP2* avec le traitement W5, et ceci en l'absence de sollicitation mécanique. Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que les traitements W7 et W5 pouvaient conduire à une augmentation du calcium cytosolique dans les 100 à 500 secondes suivant l'ajout, et durant 5 à 10 minutes (Kaplan *et al.*, 2006). Ceci pourrait donc expliquer l'induction de l'expression de *PtaZFP2* observée au cours du traitement W5 seul. Dans le cas de W7, si la durée du prétraitement des cellules est réduite



à 15 minutes (au lieu d'une heure), nous avons effectivement observé l'induction de *PtaZFP2* dans les cultures cellulaires et ceci probablement à cause du pic de calcium précoce déclenché par cet antagoniste des calmodulines. Toutefois, cette hypothèse n'est pas suffisante pour expliquer l'effet de W5 dans nos conditions expérimentales : (i) les cellules ont été traitées pendant 1h avec W5 et W7 avant de réaliser la cinétique de prélèvement et les analyses moléculaires se situent donc bien après le pic calcique observé lors de l'étude de Kaplan *et al.*, et (ii) nous n'observons aucune induction par le W7 seul dans ces mêmes conditions alors que chez *Arabidopsis thaliana*, W7 déclenchait un pic de calcium 4 fois plus intense que W5.

Les cellules de peuplier traitées avec du  $\text{LaCl}_3$  et du  $\text{GdCl}_3$  sont toujours capables de répondre à la sollicitation mécanique. Ce sont des inhibiteurs des canaux calciques de la membrane plasmique (et des canaux mécanosensibles plus précisément pour le  $\text{GdCl}_3$ ) et on pourrait donc en conclure que, bien que l'application de calcium extracellulaire soit capable d'induire l'expression de *PtaZFP2* dans des cellules de peuplier (Chapitre 1, (Gourcilleau *et al.*, soumis)), d'autres sources cellulaires de calcium seraient impliquées au cours de la réponse au stress mécanique. Toutefois, les données de la bibliographie ne vont pas dans ce sens : le calcium extracellulaire est plus généralement montré comme impliqué dans la réponse au stress mécanique (Jones and Mitchell, 1989; Knight *et al.*, 1991; Knight *et al.*, 1992; Legue *et al.*, 1997). Polisensky et Braam (1996) ont montré que l'induction des gènes *TCH* pouvait être supprimée par des traitements  $\text{LaCl}_3$  et  $\text{GdCl}_3$  mais ceci pour des concentrations élevées (5 à 10 mM). Des concentrations inférieures (de 10  $\mu\text{M}$  à 2 mM) n'inhibent pas l'accumulation des gènes *TCH* en réponse au froid et au contraire conduisent à une induction des gènes en présence ou en absence de stress (Polisensky and Braam, 1996). Ces résultats sont similaires à ce que nous observons lors du traitement des cellules de peuplier avec du  $\text{GdCl}_3$  seul. L'induction de l'expression de *PtaZFP2* par un traitement  $\text{LaCl}_3$  seul a également été observée pour le  $\text{LaCl}_3$  dans d'autres expériences pour des temps de traitement plus courts. Pour expliquer ces résultats, Polisensky et Braam supposent que l'inhibition des canaux calciques de la membrane favorise une entrée de calcium dans le cytoplasme depuis la vacuole (ou autres organites cellulaires) afin de rétablir l'homéostasie : en bloquant l'entrée de calcium extracellulaire, on favorise les mouvements de calcium intracellulaire (Polisensky and Braam, 1996). La voie calcique n'est donc pas réellement



inhibée. Le calcium joue probablement un rôle dans la réponse au stress mécanique de *PtaZFP2*, comme le montre l'implication des calmodulines, mais il faudrait tester d'autres inhibiteurs ou chélateurs, seuls ou en combinaison et à différentes concentrations pour préciser l'origine du  $\text{Ca}^{2+}$  mis en jeu.

Le DPI et le DIECA, respectivement inhibiteurs de la voie des EAO ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et des jasmonates, inhibent l'accumulation de *PtaZFP2* en réponse au stress mécanique dans des cellules de peuplier. L' $\text{H}_2\text{O}_2$  et les jasmonates pourraient donc jouer un rôle dans la cascade de réponse au stress mécanique impliquant *PtaZFP2*. D'après ces résultats, ces molécules interviendraient en amont de *PtaZFP2*. L'implication des EAO (Yahraus *et al.*, 1995; Orozco-Cardenas and Ryan, 1999; Slesak *et al.*, 2008) et des jasmonates (Mauch *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2005; Tretner *et al.*, 2008; Lakhal, 2010) a déjà été montrée dans la réponse au stress mécanique chez plusieurs espèces. Toutefois, d'autres expériences doivent être menées pour mieux comprendre leur lien avec la voie de signalisation du stress mécanique : (i) des inhibiteurs d'autres sources d'EAO pourraient être testés (le DPI est un inhibiteur spécifique de la NADPH oxydase) et (ii) on pourrait déterminer quel est le produit de la voie des jasmonates réellement impliqué dans la régulation de *PtaZFP2* (OPDA, JA, JA-Ile...).

De plus, nous avons montré que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  n'était plus capable d'induire l'expression de *PtaZFP2* en présence de W7. Ceci suggère que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  se situerait en amont des calmodulines dans la cascade de réponse. Toutefois, ces résultats préliminaires doivent être confirmés en étudiant l'association W5 et  $\text{H}_2\text{O}_2$  sur les cellules et il serait intéressant de tester la combinaison inverse (prétraitement des cellules avec un inhibiteur de la production d'EAO puis ajout de calcium). Monshausen et ses collaborateurs (2009) ont montré que l'augmentation de calcium observée suite à une sollicitation mécanique de la racine d'*Arabidopsis thaliana* (toucher, flexion ou barrière en plexiglas), était responsable de la production d'EAO. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de canaux calciques ( $\text{LaCl}_3$  et  $\text{GdCl}_3$ ) inhibe la production d'EAO en réponse au stress mécanique, démontrant un lien calcium/EAO dans la mécanoperception. Ici, nous démontrons un lien EAO/calmoduline complémentaire intéressant.





### 3. Etude des zones importantes du promoteur de *PtaZFP2*

Dans un deuxième temps, nous avons voulu déterminer les régions importantes du promoteur de *PtaZFP2* (1) dans la réponse au stress mécanique et (2) dans la régulation de *PtaZFP2* par les différentes molécules identifiées précédemment. Pour cela nous avons utilisé des constructions contenant le promoteur de *PtaZFP2* entier ou délété, placé en amont des gènes rapporteurs *GFP* et *GUS*.

A ce jour, 7 souches d'*Agrobacterium* transformées et 1 seule lignée de cals de peuplier transformés sont à notre disposition. Cette lignée a été utilisée pour les tests en cultures cellulaires. Dans cette lignée transformée, les résultats suggèrent que le promoteur délété ne répond ni au stress mécanique, ni aux différents traitements appliqués (calcium, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cycloheximide). Dans cette lignée, seules les 210 pb en amont de l'ATG sont présentes et donc la majorité des boîtes de réponses absentes. La présence d'un élément *cis* répondant à l'obscurité et à la déshydratation sur cette construction (Figure 35a), n'est pas suffisante pour induire l'expression du gène dans la réponse au stress mécanique. Toutefois ces résultats sont très préliminaires puisque les autres constructions doivent être testées en parallèle et, dans le cas de cette construction (-210 pb), d'autres lignées obtenues dans des événements indépendants de transformation doivent être étudiées.

Au début de ce travail de thèse, nous avons fait le choix de travailler sur des transformations génétiques stables. En effet, il nous paraissait important de conserver l'intégrité du continuum paroi cellulaire-membrane plasmique-cytoplasme lors de l'application des sollicitations mécaniques. Nous n'avons donc pas testé de transformations transitoires de protoplastes, dépourvus de leur paroi. Les premières lignées cellulaires transformées semblent avoir perdu la construction à l'exception d'une lignée (-210 pb). Puisque, au cours de la transformation génétique, nous n'avons pas été jusqu'à la régénération des plantes (nous nous sommes arrêté au « stade cal »), nous émettons l'hypothèse que des cellules non-transformées présentes dans les cals, ont pu se diviser plus rapidement que les cellules transformées malgré la présence de l'antibiotique pendant plusieurs phases de repiquages des cals. Nous aurions pu faire le choix de régénérer des plantes transgéniques entières et, après plusieurs cycles de repiquage, initier des cals à



partir d'entre-nœuds de plantes transformées. Cependant cette obtention de lignées de plantes génétiquement transformées est longue chez le peuplier (2 ans). Vu les problèmes rencontrés lors de la sélection des cals, cette approche pourrait être envisagée et des sollicitations mécaniques type flexion pourraient être appliquées sur ces plantes transformées.

Une étude de promoteurs utilisant des délétions successives comme notre étude, placées en amont du gène *GUS* a déjà été réalisée chez le tabac par agroinfiltration (Yang *et al.*, 2000). Dans cette étude, les constructions contenant les différentes délétions du promoteur ont été agroinfiltrées et l'activité *GUS* mesurée. Ceci a permis d'identifier les éléments *cis*-régulateurs responsables de la réponse à l'acide salicylique ou à une infection par le TMV (Tobacco Mosaic Virus). L'utilisation de la technique d'agroinfiltration avec nos différentes délétions pourrait être envisagée : les feuilles de tabac agroinfiltrées pourraient ensuite être soumises à une sollicitation mécanique (blessure, enroulement...) ou à différents traitements et l'activité *GUS* mesurée.

Une technique de transformation transitoire directe de cultures cellulaires par *Agrobacterium* a déjà été utilisée chez *Arabidopsis thaliana* (Berger *et al.*, 2007). Brièvement, elle consiste à mettre en co-culture des cultures cellulaires d'*Arabidopsis thaliana* avec les souches d'*Agrobacterium* transformées pendant 3 à 4 jours. Nous avons donc testé cette méthode sur des cultures cellulaires de peuplier avec des *Agrobacterium* portant les constructions avec le promoteur de *PtaZFP2* entier ou délété en amont des gènes rapporteurs *GFP* et *GUS*. Cependant, nous n'avons pas réussi à observer d'expression de la *GFP* sur les cellules présumées transformées ; des mises au point sont nécessaires pour transposer cette technique sur le peuplier.

La dernière solution resterait d'utiliser des transformations transitoires de protoplastes mais, comme nous l'avons déjà évoqué, ces transformations pourraient uniquement servir pour l'étude des effets des différents traitements. En effet, puisque les protoplastes sont dépourvus de paroi cellulaire, le continuum CPMCW n'est pas conservé et la perception de la sollicitation mécanique pourrait s'en trouver modifiée. Toutefois, tous les traitements cellulaires pourraient être réalisés et la comparaison de toutes les constructions pourrait conduire à l'identification de zone(s) importante(s) dans la régulation de *PtaZFP2* par les différentes molécules signal identifiées mais également de déterminer le positionnement du



répresseur potentiel présent sur ce promoteur, mis en évidence grâce au traitement à la cycloheximide (*cf.* Chapitre 1).

Récemment, une étude utilisant des délétions du promoteur du gène *CBF2* (jouant un rôle dans la tolérance au froid d'*Arabidopsis thaliana*) placé en amont du gène rapporteur *GUS*, a permis d'identifier des éléments *cis* régulateurs (CM1 à 7) impliqués dans la tolérance au froid (Doherty *et al.*, 2009). Ces éléments sont retrouvés dans le promoteur de 13 gènes parmi 30 identifiés comme étant sur-exprimés en réponse au froid. Parmi ces gènes on retrouve le gène *ZAT12* codant une C2H2-ZFPs. Au moins un de ces éléments (CM2) serait impliqué dans la réponse à la sollicitation mécanique. On retrouve 4 de ces éléments sur le promoteur de *PtaZFP2* avec seulement une substitution de base : CM2 (CCGCGT) en position -1281 pb et -1431 pb (CCGIGT), CM3 (AGAGAC) en position -192 pb (AAAGAC), CM5 (CTT A/C GCTG) en position -68 pb (CTTIGCTG) et CM6 (AGATTCTCA) en position -717 pb (AAATTCTCA). Avant cette étude, une seule boîte de réponse « mécanosensible » a été identifiée *in silico* à ce jour (Walley *et al.*, 2007). Walley et ses collaborateurs ont utilisé une analyse bioinformatique et ont identifié un motif sur-représenté dans les promoteurs de gènes de réponse rapide à la blessure et l'ont qualifié d'élément de réponse rapide au stress (RSRE, *Rapid Stress Response Element*). Un élément de ce type CGCGTT est présent dans le promoteur de *PtaZFP2* (CGCGCTT, en position -467 pb). Un autre élément *cis* de type CGCG-box (A/T/G CGCG G/T/C) a été identifié dans les promoteurs de gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'éthylène, de l'acide abscissique ou de réponse à la lumière (Yang and Poovaiah, 2002). Cette boîte de réponse permettrait la fixation de facteurs de transcription activés par les calmodulines. Deux CGCG-box sont retrouvées sur le promoteur de *PtaZFP2* : ACGCGC en position -467 pb (correspondant également à l'élément RSRE) et ACGCGG en position -321 pb. Ces différents éléments *cis* (CM, RSRE et CGCG-box) pourraient ainsi être des pistes pour la compréhension de la régulation de *PtaZFP2* en réponse à la sollicitation mécanique.



## E. Conclusion

Cette étude nous a permis de définir un système d'application d'une sollicitation mécanique sur des cultures cellulaires nous permettant par la suite de réaliser des analyses moléculaires. L'induction du gène mécanosensible *PtaZFP2* témoigne de l'efficacité de cette sollicitation, dans une cinétique d'induction comparable à celle observée pour la flexion de la tige et celle-ci pourrait donc être utilisée pour tester une corrélation entre les fréquences de sollicitation et l'expression du gène.

Nous avons également pu valider l'implication des molécules identifiées comme régulant l'expression de *PtaZFP2* dans sa réponse au stress mécanique et des liens entre ces acteurs ont pu être établis. L'étude des gènes appartenant aux différentes voies et l'utilisation d'autres inhibiteurs pourraient permettre d'établir une chronologie plus précise de la voie de signalisation du stress mécanique impliquant *PtaZFP2*.

Finalement, la construction des lignées cellulaires transgéniques (ou de plantes transgéniques) doit être poursuivie et devrait être un bon outil afin d'analyser plus précisément le promoteur de *PtaZFP2* et sa régulation. Des éléments *cis* mécanosensibles pourraient éventuellement être identifiés.





# *Chapitre 3*

*Etude de la protéine PiaZFP2*



## A. Introduction

Dans les deux premières parties, nous avons identifié des molécules capables de réguler l'expression de *PtaZFP2* en réponse à une sollicitation mécanique. Dans le but de mieux comprendre le rôle de *PtaZFP2* dans la voie de signalisation du stress mécanique, il est maintenant important d'étudier la fonction et le rôle de la protéine *PtaZFP2*.

La plupart des ZFPs de type C2H2 sont considérées comme des facteurs de transcription du fait de la présence des deux doigts de zinc capables d'interagir avec l'ADN (Klug and Schwabe, 1995). Chez les plantes, c'est l'étude de la protéine ZPT2-1 de pétunia qui a permis pour la première fois d'identifier une C2H2-ZFP et d'attribuer une fonction de facteur de transcription à cette famille de protéines : la protéine interagit spécifiquement avec le promoteur du gène codant pour l'*EPSPS* et régule son expression (Takatsuji *et al.*, 1992).

Plusieurs études montrent l'implication de ces protéines dans les réponses aux facteurs abiotiques chez de nombreuses espèces. Cependant, leur activité en tant que facteur de transcription n'est pas systématiquement démontrée et leurs cibles souvent inconnues. Or, des études récentes ont montré que certaines ZFPs étaient capables de se lier avec l'ARN ou d'autres protéines et ne seraient donc pas uniquement des facteurs de transcription (Brown, 2005; Gamsjaeger *et al.*, 2007).

Toutefois, dans certains cas, la fonction de ces protéines a été testée. Par exemple, des plantes transgéniques sur-exprimant le gène *SCOF-1* du soja présentent une augmentation de la tolérance au froid. Des tests en levure par une approche double hybride ont permis de montrer l'interaction de *SCOF-1* avec *SGBF-1*, un facteur de transcription de type bZIP. Ces facteurs de transcription de type bZIP sont connus pour être induits par le froid et pour interagir avec des éléments *cis*, comme les ABRE, des gènes régulés par le froid. Dans cette étude, la localisation nucléaire de *SCOF-1* a été démontrée ainsi que son interaction avec une autre protéine, mais son activité de type facteur de transcription n'a pas été testée (Kim *et al.*, 2001).

C'est chez *Arabidopsis thaliana* que les gènes de cette famille ont été le mieux caractérisés. Des plantes transgéniques ont permis d'étudier l'implication de *ZAT7* dans la réponse au stress salin, *STZ/ZAT10* dans les stress oxydatif, salin, thermique et osmotique et



*ZAT12* dans les stress oxydatif, osmotique, salin, lumineux et thermique (Davletova *et al.*, 2005; Mittler *et al.*, 2006; Ciftci-Yilmaz *et al.*, 2007). Des expériences réalisées *in vitro* ont montré que *ZAT7*, *ZAT10* et *ZAT11* agissent en tant que répresseurs de la transcription (Ohta *et al.*, 2001, Ciftci-Yilmaz *et al.*, 2007). Les cibles du gène *ZAT11* n'ont pas été clairement identifiées mais des approches transcriptomiques ont permis d'isoler des gènes sur ou sous-exprimés chez des lignées sur-exprimant *ZAT10* ou *ZAT12*, et donc directement ou indirectement régulés par ces protéines. En ce qui concerne *ZAT7*, des protéines interagissant avec *ZAT7* (*WRKY70* et *HASTY*) ont été identifiées par la technique du double hybride (Ciftci-Yilmaz *et al.*, 2007).

Au laboratoire, des lignées de peuplier sous ou sur-exprimant *PtaZFP2* ont été construites. Les lignées RNAi sous-exprimant le gène sous contrôle d'un promoteur fort n'ont pas pu être régénérées, témoignant certainement de l'importance du gène au cours de la régénération des plantes et en particulier au moment de la callogenèse (Martin, 2009). Les plants sur-exprimant le gène *PtaZFP2*, cultivées dans des conditions normales, présentent une réduction de la croissance primaire et une augmentation de la croissance en diamètre. La réponse physiologique de ces plantes transgéniques à la flexion (stress mécanique) ou à d'autres stress abiotiques est en cours de caractérisation. Toutefois, des expériences préliminaires semblent montrer que ces plants de peupliers sur-exprimant *PtaZFP2* semblent diminuer la quantité de transcrits de certains gènes mécanosensibles (*ACS6*, *TCH2*, *TCH4* et *PtaZFP2* endogène) ou de la voie des jasmonates (*LOX3*, *JAZ5* et *MYC2*), en condition témoin ou en réponse à une flexion (Lakhal, 2010). Ceci pourrait être en adéquation avec le fait que les C2H2-ZFPs agissent souvent comme répresseurs.

Dans ce contexte, il nous paraissait important, dans un premier temps, de vérifier que *PtaZFP2* code un facteur de transcription. Si la protéine *PtaZFP2* est réellement un facteur de transcription, elle pourrait réguler plusieurs dizaines de gènes et l'analyse transcriptomique des plantes de peuplier sur-exprimant ce gène permettrait d'accéder à ce régulon. Nous avons donc testé par agroinfiltration si, comme attendu pour un facteur de transcription, la protéine *PtaZFP2* était localisée au niveau du noyau. Nous avons également produit et caractérisé des outils moléculaires permettant de mieux analyser la fonction de cette protéine : (i) une protéine hétérologue produite dans *E.Coli* dans le but de tester son interaction avec l'ADN et (ii) des anticorps spécifiques anti-*PtaZFP2*.



Finalement, à l'aide des anticorps anti-PtaZFP2 et grâce à la détection de cette protéine, nous avons tenté de répondre à plusieurs questions: existe-t-il des tissus plus ou moins mécanosensibles au sein de la tige (localisation tissulaire de PtaZFP2)? Quelle est la cinétique d'accumulation et la stabilité de cette protéine en réponse à une flexion ? En effet, les cinétiques d'accumulation des ARNm de *PtaZFP2* observées suite à une flexion ne nous renseignent pas sur la cinétique d'accumulation de la protéine. Dans certains cas, des ARNm peuvent s'accumuler dans la cellule sans être traduits en protéine. De même, la protéine PtaZFP2 peut être une protéine très stable contrairement à l'accumulation transitoire observée pour les ARNm.



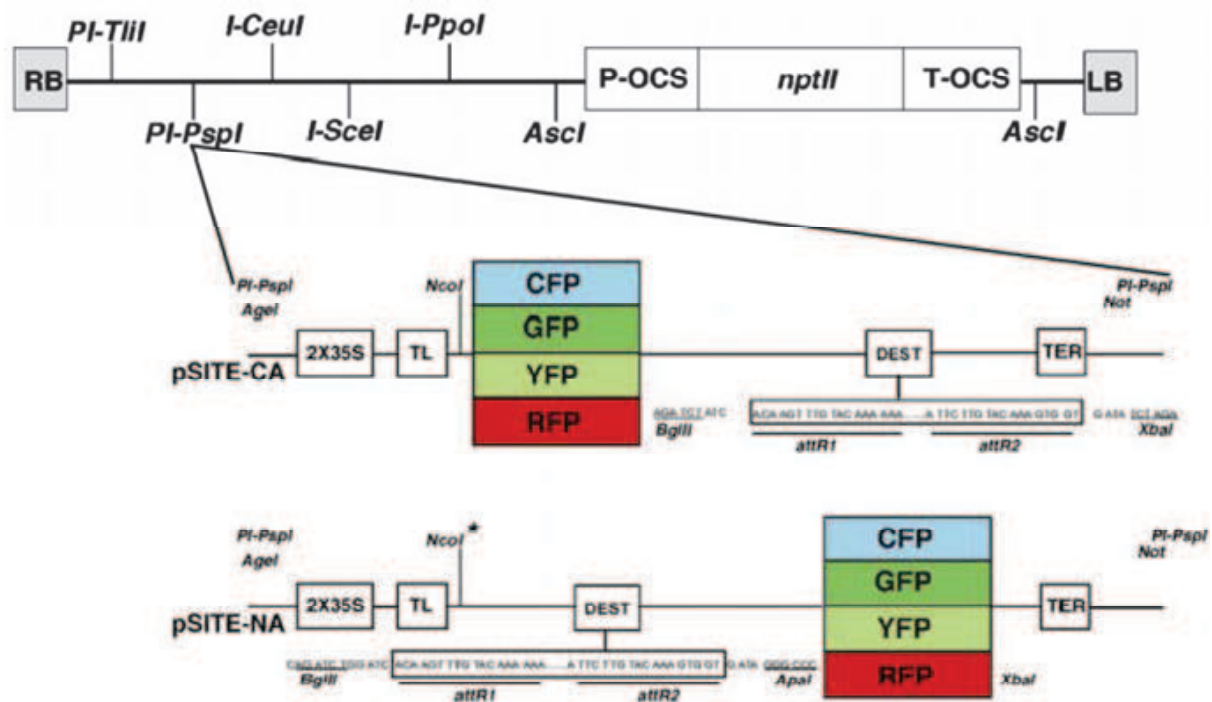


Figure 39 : Représentation schématique des différents vecteurs pSITE permettant la production d'une protéine d'intérêt en fusion avec la GFP. Les séquences d'intérêt sont insérées par la technique Gateway au niveau des sites de recombinaison attR1 et attR2 au sein du T-DNA de chaque vecteur (Chakrabarty et al., 2007).

## B. Matériel et Méthodes

### 1. Production de souches d'*Agrobacterium* exprimant la protéine

#### *PtaZFP2* en fusion avec la GFP

##### a. Clonage de la fusion *PtaZFP2*-GFP par le système Gateway

La séquence codante du gène *PtaZFP2* a été amplifiée avec la Taq polymérase *Pfu* (Promega, Madison, USA) en utilisant l'amorce sens 5'-CACCTTACCATGAAGAGAGAT-3' et l'amorce antisens 5'-TGTCCAAACTCCAAATTAAGG-3' à partir d'ADNc de peuplier (Martin *et al.*, 2009). Les produits de PCR ont ensuite été séparés en gel d'agarose 0,8% puis excisés et purifiés à l'aide du kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences, Freiburg, Allemagne).

Le clonage dans le vecteur d'entrée pENTR/D (Annexe 2) a été réalisé avec un ratio 0,4/1 à 1/1 (insert/vecteur) selon les recommandations du fournisseur (pENTR Directional TOPO® Cloning, Invitrogen). Des bactéries *E.coli* TOPO 10 compétentes ont été transformées par choc thermique avec la moitié de la réaction de clonage. Les colonies contenant les constructions désirées ont été sélectionnées avec de la kanamycine (50 µg.mL<sup>-1</sup>) et criblées par PCR sur colonie avec les amorces M13 (Annexe 2). L'ADN plasmidique de la construction a ensuite été isolé par la méthode de lyse alcaline. Les recombinaisons entre le vecteur d'entrée pENTR/D portant la séquence codante de *PtaZFP2* et les vecteurs de destination pSITE-2CA et 2NA pour lesquels *PtaZFP2* est inséré respectivement en aval et en amont de la *GFP* (Figure 39) (Chakrabarty *et al.*, 2007) ont été réalisées avec l'enzyme LR clonase II selon les instructions du kit pENTR Directional TOPO® Cloning (Invitrogen). Les constructions finales 2CA-Pta et 2NA-Pta ainsi que des vecteurs « vide » 2CA et 2NA (témoins négatifs de l'agroinfiltration) ont été transférées dans des bactéries *E.coli* TOPO 10 par choc thermique, sélectionnées avec la spectinomycine (50 µg.mL<sup>-1</sup>) et criblées par PCR sur colonie avec des amorces spécifiques de *PtaZFP2* (Pe1S 5'-CGTGCGAGTCACAAGAAACC-3' et Pe1AS 5'-CACAGAACTCTCTTGCTGCT-3') d'une part et des amorces spécifiques de *GFP* (GFP-S 5'-TATATCATGGCCGACAAGCA-3' et GFP-AS 5'-GAACTCCAGCAGGACCATGT-3') d'autre part.

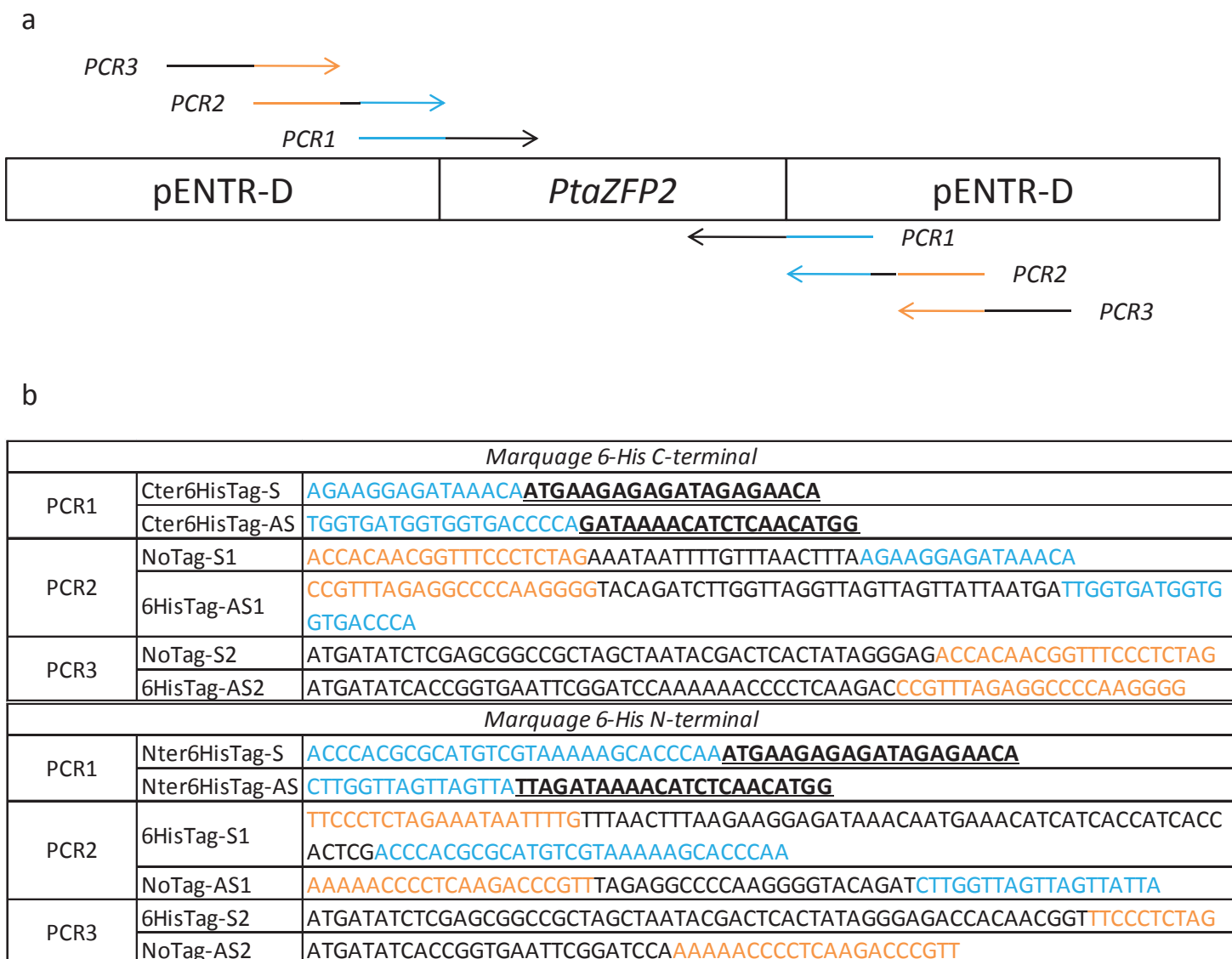


**b. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens***

La souche C58pMP90 d'*Agrobacterium tumefaciens* (Koncz and Schell, 1986) a été transformée avec les différentes constructions plasmidiques (2CA-Pta, 2NA-Pta, 2CA et 2NA) par électroporation. Brièvement, les agrobactéries ont été décongelées sur la glace et 200 ng de plasmide ont été ajoutés. La suspension a ensuite été placée dans une cuve à électroporation avec des électrodes distantes de 0,2 cm. Une décharge électrique de 2800 V (soit  $14000 \text{ V.cm}^{-1}$ ) a été appliquée avec un électroporateur EC100 (EC Apparatus Corporation). Après la décharge, les agrobactéries ont immédiatement été placées dans 950  $\mu\text{L}$  de milieu LB liquide à 28°C pendant 2h. Les bactéries ont ensuite été étalées sur un milieu LB solide additionné des antibiotiques adaptés (gentamycine + rifampicine + spectinomycine). Après une incubation de 48h à 28°C, les colonies étaient formées. La transformation et les constructions ont été vérifiées après extraction de l'ADN plasmidique et PCR avec les amorces de *PtaZFP2* (Pe1S et Pe1AS) d'une part et des amorces spécifiques de *GFP* (GFP-S et GFP-AS) d'autre part.

*2. Tests d'agroinfiltration sur des plants de tabac*

Des plants de tabac de 3 à 4 semaines et cultivés *in vitro* sur un milieu MS ½ (Murashige and Skoog, 1962) ont été utilisés. Les plants ont été sortis des conditions *in vitro* deux jours avant l'agroinfiltration, et mis en terre (après avoir rincé les racines) dans des petits pots conservés dans des sachets en plastique afin de maintenir une atmosphère très humide. Le but était de maintenir les stomates ouverts et de freiner la synthèse de cuticule afin de favoriser l'infiltration. Parallèlement les *Agrobacterium* transformées ont été mises en culture sur la nuit à 28°C et sous agitation (200 rpm) dans 5 mL de milieu LB liquide additionné des antibiotiques adaptés (gentamycine + rifampicine + spectinomycine). Puis, 1 mL de cette culture a été repris dans 20 mL de LB liquide additionné des mêmes antibiotiques, 10 mM MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) et 20  $\mu\text{M}$  acétosyringone (3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone) et mis en culture sur la nuit à 28°C et sous agitation (200 rpm). Les bactéries ont été culotées par centrifugation et reprises dans une solution 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM MES et 100  $\mu\text{M}$  acétosyringone jusqu'à obtenir une  $\text{DO}_{600}=2$ .



**Figure 40 : Amplifications PCR réalisées et amorces utilisées pour inclure l'étiquette 6 Histidines en amont ou en aval de la séquence codante de *PtaZFP2* pour la production de la protéine *PtaZFP2* dans *E.coli*.** 3 PCR successives ont été réalisées : la PCR1 a été réalisée à partir d'ADN plasmidique du vecteur pENTR-D contenant la séquence codante de *PtaZFP2* ; la PCR2 à partir du produit de la PCR1 et la PCR3 à partir du produit de la PCR2 (a). Les séquences des amorces utilisées pour ces 3 PCR sont décrites en (b). Les parties des amorces de la PCR1 se fixant à la séquence de *PtaZFP2* sont soulignées et en gras, les parties des amorces de la PCR2 se fixant sur les produits de PCR1 sont en bleu et les parties des amorces de la PCR3 se fixant sur les produits de PCR2 sont en orange.

Les infiltrations de la solution d'agrobactéries ont alors été réalisées à l'aide d'une seringue (sans aiguille) sur la face inférieure des feuilles.

Les observations ont eu lieu 2 à 3 jours après l'agroinfiltration. Les feuilles ont été montées entre lame et lamelle dans une goutte d'eau et ont été observées au microscope (Zeiss Axioplan 2, Jena, Allemagne) équipé d'une lampe fluorescente et d'un filtre d'excitation de bande passante 455-495 nm et d'un filtre barrière 505-555 nm. Les images ont été prises à l'aide du logiciel Axiovision (Zeiss) et de la caméra AxioCam HR (Zeiss).

### 3. Production d'une protéine étiquetée 6-Histidines dans *E.coli*

#### a. Transformation des bactéries

L'ADN plasmidique d'un vecteur pENTR-D contenant la séquence codante de *PtaZFP2* a été extrait par la méthode de la lyse alcaline. La séquence codante du gène a été amplifiée par 3 PCR successives avec l'AccuPrime Pfx DNA polymerase (Invitrogen) en utilisant les amorces décrites dans la Figure 40 et permettant d'ajouter un tag 6-histidines en C-terminal ou en N-terminal, ainsi que les sites de restriction nécessaires à la ligation dans le vecteur pIX3.0 (Quiagen, Annexe 6). Les produits de PCR ont ensuite été séparés en gel d'agarose 0,8% puis excisés et purifiés à l'aide du kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences, Freiburg, Allemagne).

Les produits PCR et le vecteur pIX3.0 ont été digérés avec les enzymes *EcoRI* et *XhoI* (Biolabs) pendant 1h à 37°C puis les enzymes ont été inactivées à 65°C pendant 20 min. Le clonage dans le vecteur pIX3.0 a été réalisé avec un ratio 1/1 (insert/vecteur) en utilisant la ligase du kit pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN plasmidique des constructions a ensuite été isolé par la méthode de la lyse alcaline et séquencé pour vérification. Des bactéries *E.coli* BL21-AI (Invitrogen) compétentes ont été transformées par choc thermique avec environ 40 ng d'ADN plasmidique. Les colonies contenant les constructions désirées ont été sélectionnées avec de la carbenicilline (100 µg/ml) et criblées par PCR sur colonie avec la Taq Polymerase CORE kit (Sigma) en utilisant les amorces M13-rev (Annexe 6) et Pe1S 5'-CGTGCGAGTCACAAGAAACC-3' située sur la séquence de *PtaZFP2*. La présence du vecteur et de l'insert dans les bactéries



a été vérifié par extraction de l'ADN plasmidique (méthode de la lyse alcaline) et double-digestion avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *XhoI*. L'insert a également été séquencé grâce aux amorces M13 présentes sur le vecteur de part et d'autre de l'insert (Annexe 7).

### **b. Culture bactérienne et induction de la production de protéines**

Les bactéries ont été mises en culture dans 3 mL de milieu LB liquide additionné de carbenicilline ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) pendant une nuit à  $37^{\circ}\text{C}$  et sous agitation (200 rpm). La moitié de la culture bactérienne a été reprise dans 25 mL de milieu LB liquide additionné de carbenicilline ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) et mise sous agitation (200 rpm) à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 2h environ jusqu'à ce que la  $\text{DO}_{600} \approx 0,4$ . Deux prélèvements de 1 mL ont été réalisés et mis à centrifuger 1 min à 16 000 g et à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant a été retiré et le culot bactérien congelé jusqu'à analyse : il représente le témoin avant induction. Pour l'induction, 250  $\mu\text{L}$  de L-arabinose 20 % ont été ajoutés (0,2 % de concentration finale) et les conditions de culture sont maintenues ( $37^{\circ}\text{C}$ , agitation 200 rpm). A différents temps (30 min, 1h, 1h30, 2h, 2h30, 3h, 3h30, 4h et 5h), deux prélèvements de 1 mL ont été réalisés et mis à centrifuger 1 min à 16 000 g et à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant a été retiré et le culot bactérien congelé et conservé jusqu'à analyse.

### **c. Extraction des protéines d'*E.coli* solubles et insolubles**

Les protéines solubles et insolubles produites par *E.coli* ont été extraites par sonication. Brièvement, les culots bactériens ont été repris dans 200  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8) additionné de lysozyme ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) et laissés incuber 45 minutes dans de la glace. Les différents extraits ont subi 8 pulses de sonication de 10 secondes espacés de 10 secondes dans la glace (sonde 2 mm, amplitude 50%). Les tubes ont alors été centrifugés 30 minutes à 3000 g et à  $4^{\circ}\text{C}$  : le surnageant correspond aux protéines solubles et le culot aux protéines insolubles.





**d. Purification de la protéine marquée 6-Histidines en conditions dénaturantes**

La protéine produite et marquée avec un tag 6-Histines, a été purifiée en conditions dénaturantes avec le kit « The QIAexpressionist » en suivant les instructions du fournisseur (Qiagen). Brièvement, les culots bactériens ont été repris dans 100  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM de Tris base et 6 M d'urée, pH 8) et laissés incuber 30 minutes dans de la glace. Après une centrifugation de 10 minutes à 15 000 g et à 4°C, le surnageant a été transvasé dans un nouveau tube, 50  $\mu\text{L}$  de résine Ni-NTA (nickel - nitrilotriacetic acid) ont été ajoutés et laissés incuber 30 minutes à 4°C. Le tout a été mis à centrifuger 10 secondes à 15 000g et à 4°C, le surnageant prélevé dans un nouveau tube et la résine lavée avec 100  $\mu\text{L}$  de tampon de lavage (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM de Tris base et 6 M d'urée, pH 6,3). Cette étape de centrifugation/prélèvement du surnageant/lavage de la résine a été répétée une fois avec 100  $\mu\text{L}$  de tampon de lavage puis 3 fois avec 20  $\mu\text{L}$  de tampon d'élution (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM de Tris base et 6 M d'urée, pH 4,5). L'absorbance à 595 nm a été mesurée au spectromètre (Thermospectronic, Helios  $\alpha$ ) et la concentration a ensuite été calculée *via* une courbe-étalon d'absorbance standard établie avec différentes solutions de sérum albumine bovine (de 0 à 1,4  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ). Tous les surnageants prélevés sont stockés à -20 °C jusqu'à analyse.

**e. Détection des protéines**

Pour l'étude de la cinétique d'induction de la production de la protéine dans les bactéries, les culots bactériens récoltés à différents temps d'induction ont simplement été repris dans le tampon SDS-PAGE 1X (Tris pH 6,8 0,1 M, Glycérol 10%, SDS 0,5%, DTT 0,5%, bleu de bromophénol). Pour l'étude de la purification de la protéine marquée 6-His, un volume égal de protéines pour chaque condition a été utilisé et additionnée de tampon SDS-PAGE. Les échantillons ont été dénaturés 5 minutes à 95°C et les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel à 15 % de polyacrylamide (p/v) en même temps qu'un marqueur de poids moléculaire précoloré (Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope, Biorad). Les protéines ont ensuite été électrotransférées par transfert à sec (Semi-Dry Blotter, CBS Scientific Company) sur une membrane de nitrocellulose. La présence des



protéines sur la membrane a alors été vérifiée par une coloration de la membrane au rouge ponceau.

Après rinçage, les membranes ont été saturées par incubation à 4°C pendant la nuit en présence de tampon TBS-Tween 1,5%. Elles ont ensuite été rincées avec du TBS-Tween 0,05% et incubées pendant 1h à température ambiante dans du TBS-Tween 0,05% soit avec des anticorps purifiés anti-PtaZFP2 de lapin (dilution 1/1000<sup>ème</sup>) ou avec des anticorps anti-Histidine de souris couplés à la peroxydase (Sigma, dilution 1/50 000<sup>ème</sup>). Les membranes ont ensuite subi 3 lavages de 10 min dans du TBS-Tween 0,05%. Des anticorps secondaires anti-lapin couplés à la phosphatase alcaline (Sigma, 1/10 000<sup>ème</sup>) ont ensuite été ajoutés pour les membranes incubées avec l'anti-PtaZFP2 de lapin et laissés incubés 1h30 à température ambiante.

Après 3 rinçages de 10 min en TBS-Tween 0,05% et deux rinçages de 15 min en TBS, les membranes ont été révélées en utilisant le kit Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate (Sigma) pour les membranes incubées avec l'anticorps anti-PtaZFP2, et l'ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) pour les membranes incubées avec l'anticorps anti-Histidine, en suivant les recommandations des fournisseurs.

#### 4. Etude de l'accumulation de la protéine PtaZFP2 *in vivo*

##### a. Matériel végétal et conditions de culture

Des peupliers hybrides (*Populus tremula* x *Populus alba*, clone INRA 717-1B4) ont été obtenus par une micropropagation *in vitro* sur un milieu de Murashige et Skoog (Murashige and Skoog, 1962). Lorsqu'ils ont atteint une hauteur d'environ 4 cm, les vitro-plants ont été acclimatés progressivement sur une solution nutritive (Morizet and Mingeau, 1976). Les jeunes peupliers ont été mis dans une chambre de culture à environnement contrôlé : 16 h de lumière ( $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) à 24°C (jour) et 8 h d'obscurité à 20°C (nuit), humidité relative de  $70 \pm 10\%$ . Les expériences ont été réalisées sur des plants d'environ 3 mois (hauteur de  $35 \pm 4$  cm et 20 entre-nœuds).



### **b. Sollicitation mécanique**

Des feuilles des plants de peuplier ont été prélevées et la moitié d'entre elles ont subi du « wounding » : le limbe des feuilles a été incisé à l'aide d'un scalpel. Les feuilles ont alors été plongées dans de l'azote liquide 30 minutes après l'application de la sollicitation et conservées à -80°C jusqu'à analyse.

Dans le cas des analyses sur tiges, les tiges ont subi une flexion transitoire autour d'un tube de diamètre connu et adapté au diamètre de la tige de manière à appliquer une somme de déformations identique sur chaque plante ( $S_{déf} = \frac{1}{3} r_{tige} \times \frac{1}{(r_{tube} + r_{tige})} \times L$  où  $r$  représente le rayon de la tige ou du tube et  $L$  la longueur de la zone considérée, (Martin *et al.*, 2010). La portion de tige fléchie (3 cm de longueur) a été prélevée 30 min, 60 min, 120 min ou 180 min après la flexion. Des portions de tige de 3 cm ont été prélevées sur des plantes non fléchies pour constituer les échantillons témoin.

### **c. Extractions de protéines**

Dans le cas des feuilles, l'extraction de protéines a été réalisée à partir de 2,5 g de poids frais. Dans le cas des tiges, deux portions de tige de chaque condition ont été rassemblées pour réaliser l'extraction de protéines représentant environ 2 g de poids frais.

Les extractions de protéines ont été réalisées avec le Cellytic PN Isolation/Extraction Kit for plant leaves (Sigma) en suivant les instructions du fournisseur. La concentration en protéines a été déterminée à l'aide du réactif Protein Assay (Bio-Rad, Allemagne). L'absorbance à 595 nm a été mesurée au spectromètre (Thermospectronic, Helios  $\alpha$ ) et la concentration a ensuite été calculée *via* une courbe-étalon d'absorbance standard établie avec différentes solutions de sérum albumine bovine (de 0 à 1,4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).

### **d. Détection des protéines**

Un volume égal de protéines pour chaque condition a été utilisé et additionné de tampon SDS-PAGE. Les échantillons ont été dénaturés 5 minutes à 95°C et ont été séparés par électrophorèse sur un gel à 15 % de polyacrylamide (p/v) en même temps qu'un



marqueur de poids moléculaire précoloré (Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope, Biorad). Les protéines ont ensuite été électrotransférées par transfert à sec (Semi-Dry Blotter, CBS Scientific Company) sur une membrane de nitrocellulose. La présence des protéines sur la membrane a alors été vérifiée par une coloration de la membrane au rouge ponceau.

Après rinçage à l'eau distillée, les membranes ont été saturées par incubation à 4°C pendant la nuit en présence de tampon TBS-Tween 1,5%. Elles ont ensuite été rincées avec du TBS-Tween 0,05% et incubées pendant 2h à température ambiante dans du TBS-Tween 0,05% soit avec des anticorps purifiés anti-PtaZFP2 de lapin (dilution 1/5000<sup>ème</sup>), des anticorps anti-histone H<sub>3</sub> de chèvre (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1/1000<sup>ème</sup>) ou des IgG de lapin (100 µg.mL<sup>-1</sup>, dilution identique à celle des anticorps anti-PtaZFP2) utilisés en témoin négatif. Les membranes ont ensuite subi 3 lavages de 10 min dans du TBS-Tween 0,05%. Des anticorps secondaires anti-lapin ou anti-chèvre couplés HRP (horseradish peroxidase) (Southern Biotech et Santacruz Biotechnology respectivement, 1/10000<sup>ème</sup>) ont ensuite été ajoutés et laissés incubés 1h30 à température ambiante.

Après 3 rinçages de 10 min en TBS-Tween 0,05% et deux rinçages de 15 min en TBS, les membranes ont été révélées en utilisant l'ECL Western Blotting Detection Reagents en suivant les recommandations du fournisseur (GE Healthcare).

## 5. Immunolocalisation

### a. Sollicitations mécaniques

Les sollicitations mécaniques ont été appliquées comme décrit dans Martin *et al.* 2009. Brièvement, la partie basale d'une tige de peuplier (10 cm au dessus du collet) a été enroulée autour d'un tube en plastique d'un diamètre d'environ 32 mm en prenant soin que la somme des déformations appliquée soit toujours la même en fonction du diamètre de la tige ( $S_{déf} = (r_{tige}^2/3) \times 1/(r_{tube} + r_{tige}) \times L$  où  $r$  représente le rayon de la tige ou du tube et  $L$  la longueur de la zone considérée, (Martin *et al.*, 2010)).





**b. Fixation et inclusion du matériel végétal dans la résine**

Le matériel végétal (un morceau de tige de 5 mm) a été prélevé 30 minutes après la flexion et plongé immédiatement dans le fixateur FAA (formaldéhyde 3,7% (v/v), éthanol 50% (v/v), acide acétique 5% (v/v)) et placé sous vide (cloche à vide) jusqu'à ce que les échantillons plongent au fond du tube. Les échantillons ont alors été incubés dans du fixateur frais pendant 4h à 4°C puis déshydratés par des bains successifs d'éthanol 50%, 70%, 80%, 95% et 3 x 100% pendant 30 min et à 4°C. La déshydratation des tissus a été suivie d'une imprégnation progressive à 4°C dans la résine LR-White Medium (Sigma) : 30 min d'incubation successivement dans des mélanges éthanol 100% 2/3 : résine 1/3 ; éthanol 100% 1/2 : résine 1/2 ; éthanol 100% 1/3 : résine 2/3, puis 1 bain de 1h dans la résine pure. La résine pure a ensuite été renouvelée pour la nuit. Les échantillons ont été placés dans des gélules (« gelatin capsule ») remplies de résine et placés à 55°C jusqu'à polymérisation complète de la résine.

**c. Coupes histologiques**

Des coupes transversales d'environ 3 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome (OMU2, Reichert) équipé d'un couteau de verre et immédiatement placées dans du PBS 1X.

**d. Immunolocalisation in situ**

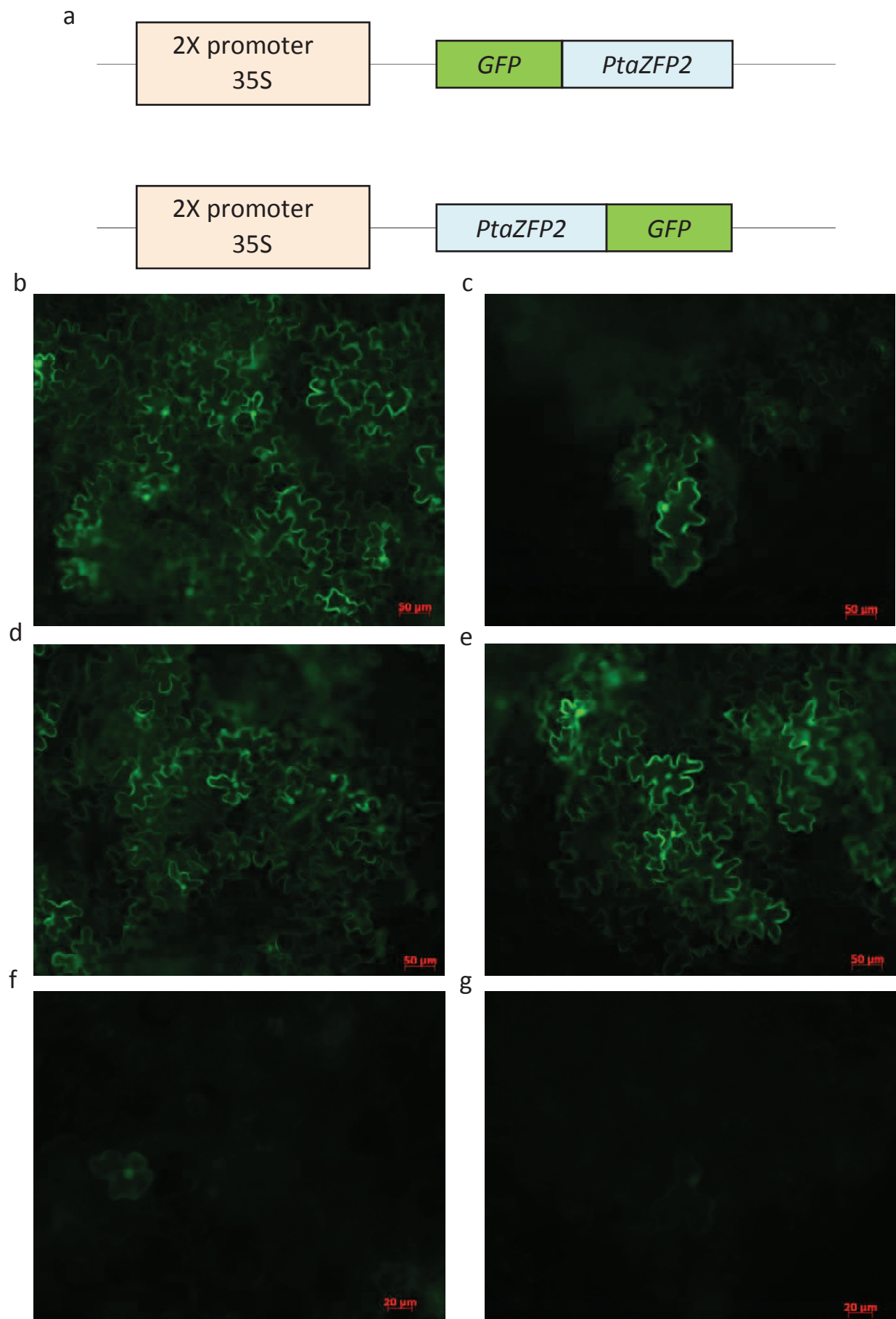
La perméabilisation des coupes et la saturation des sites aspécifiques ont été réalisées grâce à plusieurs bains réalisés à température ambiante : PBS 1X (10 min), PBS 1X + Triton X-100 0,1% (15 min), PBS 1X + Triton X-100 0,1% + Glycine 0,2% (15 min), PBS 1X + Triton X-100 0,1% (10 min), PBS 1X + Triton X-100 0,1% + Tween 20 0,2% + BSA 0,1% (Bovine Serum Albumine) + NGS 5% (Normal Goat Serum) (45 min, obscurité). La réaction avec l'anticorps primaire a été réalisée en diluant l'anticorps primaire (anti-PtaZFP2 purifié produit chez le lapin) ou le sérum pré-immun (témoin négatif) dans ce dernier tampon de saturation



(plusieurs dilutions ont été testées : 1/250<sup>ème</sup>, 1/500<sup>ème</sup> et 1/1000<sup>ème</sup>), pendant une nuit, à température ambiante et dans une atmosphère humide. Les coupes ont ensuite été lavées à température ambiante 2 fois dans du PBS 1X + Triton X-100 0,1% (2 x 20 min) et 2 fois dans du TBS pH 8,2 + Triton X-100 0,2% (2 x 15 min). Les sites non spécifiques ont été saturés pendant 45 min à température ambiante et à l'obscurité dans du TBS pH 8,2 + Triton X-100 0,2% + Tween 20 0,2% + BSA 1% + NGS 5%. Les coupes ont alors été mises en présence de l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (Goat anti-rabbit, Sigma) et dilué au 1/40<sup>ème</sup> dans ce tampon de saturation : incubation 2h30 à l'obscurité et à température ambiante. Les lavages ont été réalisés à température ambiante par 3 bains de TBS pH 8,2 + triton X-100 0,2% (3 x 20 min).

**e. Réaction de coloration**

Les révélations ont été réalisées à l'aide du kit AP conjugate substrate (Biorad). Un premier bain dans le tampon de révélation 1X a été réalisé pendant 10 minutes à température ambiante. Les coupes ont alors été incubées dans le mélange de révélation (tampon 1X = color development buffer + 1% de NBT + 1% de BCIP) jusqu'à l'apparition de la coloration. La réaction a été stoppée par 2 bains d'H<sub>2</sub>O de 10 min puis les coupes ont été déposées sur lame et laissées sécher. Elles ont finalement été montées entre lame et lamelle dans de l'Eukitt (O. Kindler, Freiburg, Germany) et observées sous un microscope optique (Zeiss Axioplan 2).



**Figure 41 : Etude de la localisation cellulaire de PtaZFP2 analysée par agroinfiltration de feuilles de tabac.** Schéma simplifié des vecteurs 2NA et 2CA permettant la production des protéines de fusion sous contrôle du promoteur fort 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) dupliqué (a). Images obtenues sous microscopie à fluorescence dans deux zones différentes de l'épiderme de feuilles de tabac agro-infiltrées avec de l'*Agrobacterium* possédant le vecteur 2CA produisant la protéine de fusion GFP-PtaZFP2 (b et c) ou la GFP seule (d et e). Images d'épiderme de feuilles de tabac agro-infiltrées avec le vecteur 2NA produisant la protéine de fusion PtaZFP2-GFP (f) ou la GFP seule (g).

## C. Résultats

### 1. Localisation sub-cellulaire de la protéine PtaZFP2

La séquence en acides aminés prédite à partir du gène *PtaZFP2* contient tous les motifs protéiques caractéristiques retrouvés chez les protéines de type C2H2-ZFPs et en particulier les deux doigts de zinc préalablement décrits comme étant essentiels à la fixation de ce type de protéines sur l'ADN. Toutefois, l'activité de PtaZFP2 en tant que facteur de transcription n'a pas été confirmée. Dans un premier temps, nous avons donc testé si cette protéine présentait une localisation nucléaire. Pour cela, la protéine PtaZFP2 a été fusionnée avec la GFP grâce aux vecteurs pSITE 2CA et 2NA (Figure 39) (Chakrabarty *et al.*, 2007). Ainsi, la séquence codante du gène de la GFP a été insérée soit en amont (2CA), soit en aval (2NA) de la séquence codante du gène *PtaZFP2* et cette fusion a été placée sous le contrôle d'un promoteur fort (35S) (Figure 41a). Le clonage a été réalisé par la technique Gateway, assurant une insertion de la séquence codante de *PtaZFP2* en phase avec la séquence de la GFP. De plus, l'ensemble de ces constructions a été vérifié par séquençage avant utilisation. Après agroinfiltration dans des feuilles de tabac, la localisation de PtaZFP2 a été déterminée grâce à la visualisation de la GFP. Comme le montrent les Figures 41b et c, lorsqu'on observe des feuilles de tabac agroinfiltrées avec une solution d'agrobactéries produisant la protéine de fusion GFP-PtaZFP2 (vecteur 2CA), la fluorescence est détectée dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules qui est comprimé contre la paroi du fait de la turgescence de la vacuole (les expériences sont réalisées en milieu hyper-humide afin de favoriser l'ouverture des stomates lors de l'agroinfiltration). Lorsque l'on infiltre des feuilles avec une solution d'agrobactéries produisant la GFP seule (vecteur 2CA vide, témoin négatif), la fluorescence est également observée dans le noyau et le cytoplasme, témoignant d'une diffusion passive de la GFP à travers les pores nucléaires du fait de la petite taille de la GFP (27 kDa) (Figure 41d et e). Or, la taille finale de la protéine de fusion (<50kDa) permet probablement également la diffusion de cette protéine dans le noyau. Nous avons observé une très faible fluorescence pour les agroinfiltrations utilisant des agrobactéries produisant la protéine de

1er ZF		
PtaZFP2	FQALGGHRASHKKPKLMESTGN-L-----LKL	89
POPTR_0001s24250.1	FQALGGHRASHKKPKLKESTGN-L-----LKL	92
POPTR_1833s00200.1	FQALGGHRASHKKPKLKESTGN-L-----LKL	40
POPTR_0009s03280.1	FQALGGHRASHKKPKLVGSTGNLL-----MKL	89
POPTR_0010s21650.1	FQALGGHRASHKKPRLMGEGS-----FE	82
POPTR_0008s05110.1	FQALGGHRASHKKPKLMGEGS-----FE	68
POPTR_0010s23610.1	FQALGGHRASHKKPKATHNDERKKNLSPSSDEELDGHYKNVSSL-----CT	178
POPTR_0008s03220.1	FQALGGHRASHKKPKAIHNDEKKQNLSSISSEE-DGHYKNVSSLQLSE-----NNTNRGT	121
POPTR_0004s22650.1	FQALGGHRASHKRPKATA-EEKKGLVVASMEDLGVCQLIKRSNLDPSLSLQIGHNNNVNK	198
POPTR_0004s22650.2	FQALGGHRASHKRPKATA-EEKKGLVVASMEDLGVCQLIKRSNLDPSLSLQIGHNNNVNK	173
POPTR_0009s01020.1	FQALGGHRASHKRPKATAPEEKKGLVVASMEDLDDRQLNKRS-PYPCLSLQIPNNNNVNK	200
POPTR_0006s12340.1	FQALGGHRASHKKPKPGSLDHEDKKVLTTVRMAHEE-----VLC	171
POPTR_0016s10790.1	FQALGGHRASHKKSRQGNISEDKKALAVTVRMGDQEENGNDNDMSTALSQI-VNDGVLC	186
POPTR_0009s09250.1	YQALGGHKASHRKSSSES--TTAAENPST-----STTP-A	123
POPTR_0001s30260.1	YQALGGHKASHRKSSSESTVATAENPST-----STTNT	159
POPTR_0002s12010.1	YQALGGHKASHRKLAGGEDQTTSCTTTS-----ATTP-	138
POPTR_0014s01760.1	YQALGGHKASHRKLAGGEDQTTSTTTTS-----AITATK	127
2ème ZF		
PtaZFP2	PNSPSKPKTHQCSICGLEFFPLGQALGGHMRHRAPNNVDTTSNSSKDELAAVTQPPFLP	149
POPTR_0001s24250.1	PNSPSKPKTHQCSICGLEFFPLGQALGGHMRHRAPHNVDTTSSKDHLEAAVTQPPFLP	152
POPTR_1833s00200.1	PNSPSKPKTHQCSICGLEFFPLGQALGGHMRHRAPNN-----77	
POPTR_0009s03280.1	PNSPPKPKNHQCSICGLEFFPLGQALGGHMRHRAG-NIDATSN-SADNELA-VTYPPFLP	146
POPTR_0010s21650.1	TQSPAKPKTHECSICGLEFAIGQALGGHMRHRHRAA-----LNDRNQ-VDPLNPPSTD	133
POPTR_0008s05110.1	SQSPAKPKTHECSICGLEFAIGQALGGHMRHRHRAA-----LNDQNQLADPLSPSSD	120
POPTR_0010s23610.1	FSNNHKGKIHECSVCGAEFTSGQALGGHMRHRGPLL-----SSTTSLSLTPLAIESE-	231
POPTR_0008s03220.1	YSNNHKGKIHECSVCGAVFTSGQALGGHMRHRGPLV-----SSTTSLSLTPTMIESE-	174
POPTR_0004s22650.1	GFQGNKAKTHECSICGSEFMSGQALGGHMRHRANTG-----NQAGMITDSSSATAES	252
POPTR_0004s22650.2	GFQGNKAKTHECSICGSEFMSGQALGGHMRHRANTG-----NQAGMITDSSSATAES	227
POPTR_0009s01020.1	GFQANKAKIHECSICGSEFMSGQALGGHMRHRANTGA-----NQVSNISTDSSSATTES	255
POPTR_0006s12340.1	SPNVKSNKVHECSICGAEFSSGQALGGHMRHRKAFAAA-----TSTTTITTTTSTMS--	224
POPTR_0016s10790.1	SNNVKSNNKVHECSICGDEFSSGQALGGHMRHRAFAPT-----TTATATTLTSRSLERSK	241
POPTR_0009s09250.1	TTTTNTSGRTHECSICHKTFTPTGQALGGHKRCHYEIGTIGGN---NNSSTSAAITTSDSGA	179
POPTR_0001s30260.1	TTTTNTNGRTHECSICHKTFTLTGQALGGHKRCHYEIGTIGGN---NSSASAAITTSDGGA	215
POPTR_0002s12010.1	-VSGSGVVKVHECSICHRTFTPTGQALGGHKRCHYEGIGG-----AEKSGVTSTSEG--	188
POPTR_0014s01760.1	TVSNGSGKTHECSICHKTFTPTGQALGGHKRCHYEGIGG-----GEKSGVTSTSES--	178
DLN-box		
PtaZFP2	E--AVPVLKRSNSSKRVLC <del>LDLSLAL</del> PMYQNDSE-----ELQLEKV-ARPMLRCF	195
POPTR_0001s24250.1	---AVPVLKRSNSSKRVLC <del>LDLSLAL</del> PMYQNDSE-----ELQLEKV-DRPMLRCF	197
POPTR_1833s00200.1	-----	
POPTR_0009s03280.1	---AIPVLKSNSSKRVLC <del>LDLSLAL</del> PMQDNES-----ELQLRKAGTRPVLKCF	192
POPTR_0010s21650.1	DQKAVPVVKRSNS--RRVLC <del>LDLNL</del> TP--YENDM-----ELS-WSSSSNYFV---	175
POPTR_0008s05110.1	HKQVVPVKRSNS--RRVLC <del>LDLNL</del> TP--NENDM-----ELFKLGNAAPIYS---	163
POPTR_0010s23610.1	-----EPKKARNALS <del>LDLNL</del> PAPDDEKFAFASKQQQH-QQQQQQQQSTPLVFSSP	283
POPTR_0008s03220.1	-----EPKRRARNVLS <del>LDLNL</del> PAPEDDKFAFASKQQ---QKQQQQQQNTSLVFTSP	224
POPTR_0004s22650.1	NIHGDHHQ- IKPKNI--LAL <del>LDLNL</del> PAP-EDDHHLR-----ESNFQFTSTRQALVFSAT	301
POPTR_0004s22650.2	NIHGDHHQ- IKPKNI--LAL <del>LDLNL</del> PAP-EDDHHLR-----ESNFQFTSTRQALVFSAT	276
POPTR_0009s01020.1	KIHGDHHHTIKPRNM--LAL <del>LDLNL</del> PAPPEDDHHLR-----ESKFQLSSTQQPLVFSSP	306
POPTR_0006s12340.1	-----LGRKPRNN--LQ <del>LDLNL</del> LAPKDDLLEPKGCKGFVEAKLHWHEFAATDITTES	275
POPTR_0016s10790.1	PDH-ESEESKKPRDI--QL <del>LDLNL</del> PAAEDDLRE-----SKFHFKASKEQVLVFTAS	288
POPTR_0009s09250.1	VGGGGVSQSQRSGGGF <del>FDLNL</del> PALPEFEGPRIGHQALLRDQEVESPLSG-KKPR <del>LT</del> L	238
POPTR_0001s30260.1	VGGGGVIQSKQRSGGGF <del>FDLNL</del> PALPEFEGPRISLQALCGDQEVESPLPG-KKPR <del>LM</del> F	274
POPTR_0002s12010.1	--AGSTNTRTSHN <del>SHHD</del> <del>FDLNL</del> PALPEFS----SDFVSGDDEVMSPLPAAKRIRILM	242
POPTR_0014s01760.1	--AGSTNTRTSHN----E <del>FDLNL</del> PALPEFS----SCFSVSGDEVMSPLPAAKKLIRISM	228
PtaZFP2	IP-----	197
POPTR_0001s24250.1	I-----	198
POPTR_1833s00200.1	-----	
POPTR_0009s03280.1	I-----	193
POPTR_0010s21650.1	-----	
POPTR_0008s05110.1	-----	
POPTR_0010s23610.1	-----ALVDCHY-----	290
POPTR_0008s03220.1	-----ALVDCHY-----	231
POPTR_0004s22650.1	-----ALVDCHY-----	308
POPTR_0004s22650.2	-----ALVDCHY-----	283
POPTR_0009s01020.1	-----ALVDCHY-----	313
POPTR_0006s12340.1	GGLGSSLSVFSRKLRLP	292
POPTR_0016s10790.1	-----SLVDCHY-----	295
POPTR_0009s09250.1	SLQKEKTGVVSL-----	250
POPTR_0001s30260.1	SLKQEKTDMGSS-----	286
POPTR_0002s12010.1	APRIEVSQAQ-----	252
POPTR_0014s01760.1	PPRFVSQAQ-----	238

**Figure 42 : Position des peptides de synthèse utilisés pour la production de l'anticorps anti-PtaZFP2.** Les peptides sont surlignés en bleu sur la séquence de PtaZFP2. Les séquences protéiques situées entre le premier doigt de zinc et le codon STOP des autres protéines à deux doigts de zinc de type QALGGH de *Populus trichocarpa* (identifiées dans Phytozome, chapitre 1) sont alignées afin de visualiser les zones conservées. POPTR\_0001s24250.1 correspond à l'homologue de PtaZFP2 chez *Populus trichocarpa*, POPTR\_0009s03280.1 à l'homologue chez *Populus trichocarpa* de la protéine PtaZFP1 dont le gène a été étudié dans le 1er chapitre. Les deux doigts de zinc et la DLN-box sont surlignés en gris.

fusion PtaZFP2-GFP (vecteur 2NA) (Figure 41f et g). Ces résultats ne nous permettent donc pas de conclure clairement quant à la localisation sub-cellulaire de la protéine PtaZFP2.

## 2. *Production d'anticorps anti-PtaZFP2 et de la protéine marquée 6-Histidines dans *E.coli**

110

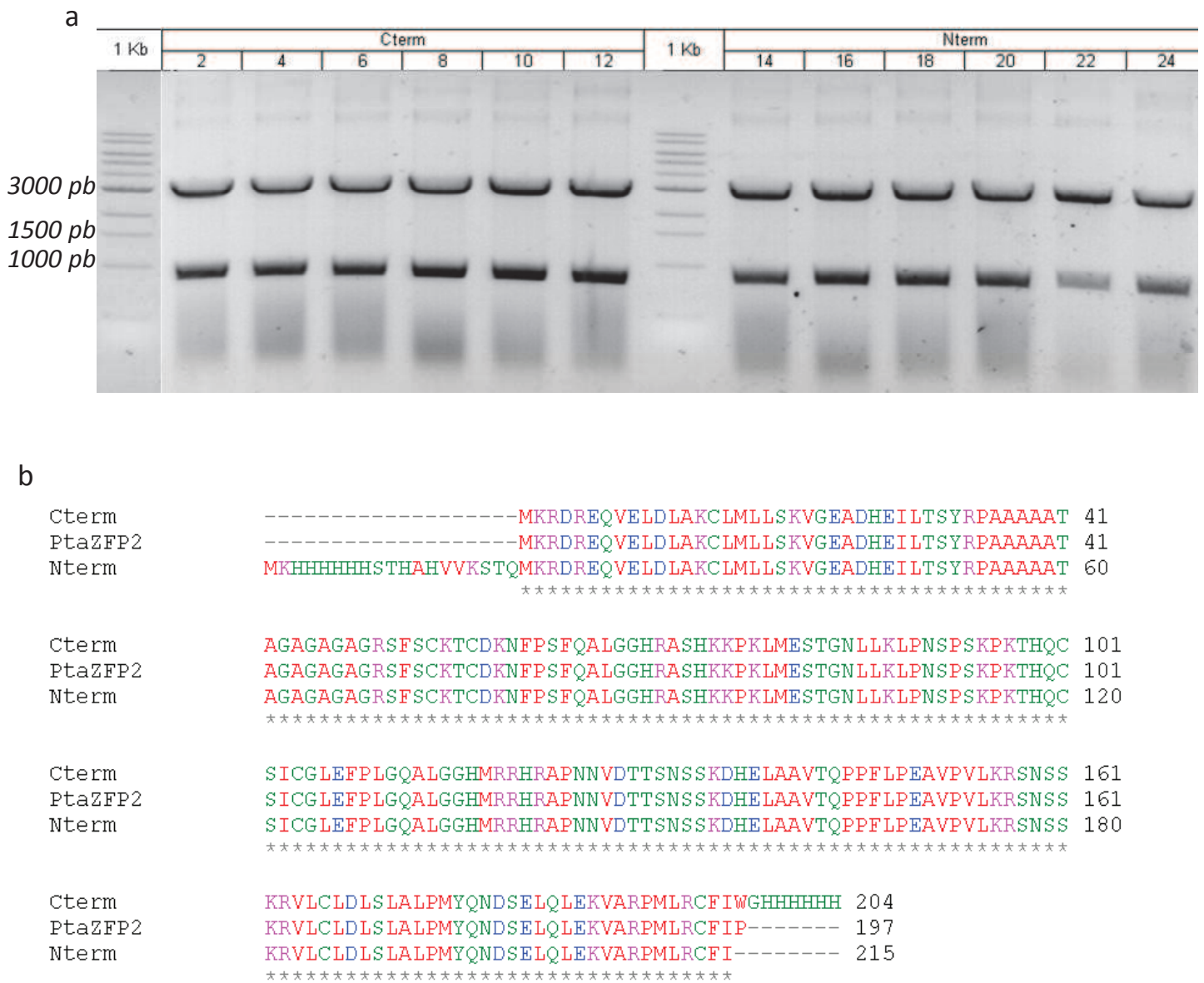
### a. Production d'anticorps spécifiques de PtaZFP2

Plusieurs outils moléculaires sont indispensables pour comprendre la fonction de PtaZFP2 chez le peuplier. Dans un premier temps et afin d'étudier la localisation tissulaire et cellulaire ainsi que la stabilité de la protéine PtaZFP2, des anticorps polyclonaux dirigés contre deux peptides de synthèse ont été produits chez le lapin. Il fallait s'assurer de la spécificité de ces anticorps : ils ne pouvaient être produits contre la protéine entière puisque les doigts de zinc sont des motifs conservés parmi toutes les Q-type C2H2-ZFPs. Pour cibler des régions peu conservées dans cette famille multigénique et afin d'être spécifique de PtaZFP2, nous nous sommes servis de l'alignement des séquences des Q-type C2H2-ZFPs identifiées chez le peuplier. Comme le montre la Figure 42, deux régions ont été définies pour les peptides de synthèse : PNNVDTTSNSSKDH et LPHYQNDSELQLEK, localisées dans la partie C terminale de la protéine. Les peptides de synthèse et les anticorps ont été produits par l'entreprise Covalab. Les anticorps anti-PtaZFP2 ont été purifiés par une chromatographie d'affinité utilisant les peptides de synthèse.

### b. Production de la protéine PtaZFP2 dans *E.coli*

Une autre approche permettant de démontrer l'activité de PtaZFP2 en tant que facteur de transcription serait de tester son interaction avec de l'ADN. Dans ce but, nous avons produit la protéine dans *E.Coli* fusionnée avec une étiquette de type 6xHis afin de faciliter sa purification des extraits protéiques bactériens. De plus, la protéine ainsi produite en système hétérologue peut être utilisée afin de tester la spécificité des anticorps obtenus contre les

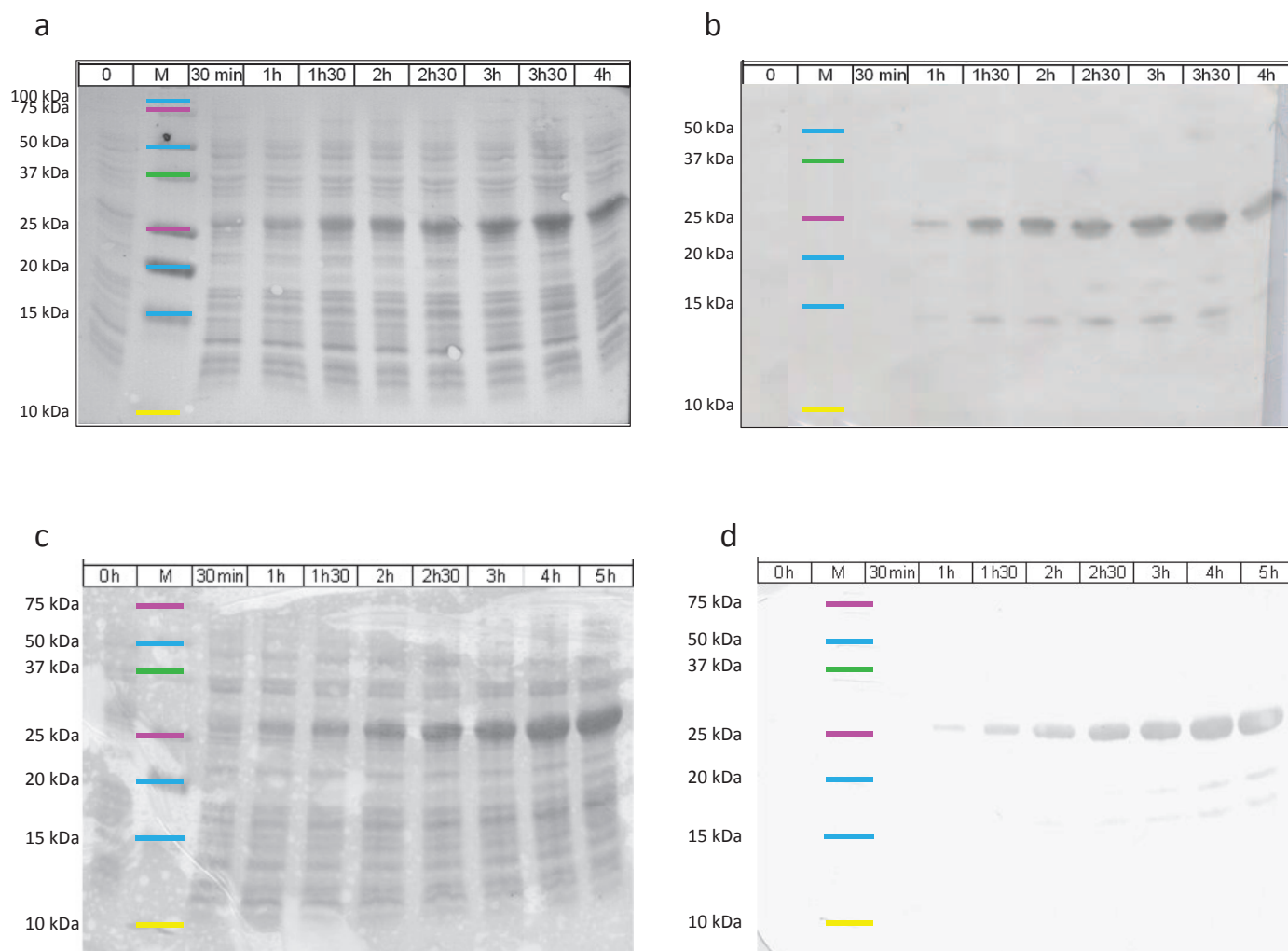




**Figure 43 : Vérification de l'insertion de la séquence de *PtaZFP2* étiquetée 6-His dans les vecteurs pIX3.0 pour la production de la protéine marquée 6-Histine en position C-terminale (Cter) ou N-terminale (Nter).** L'ADN plasmidique de différentes colonies de bactéries *E. coli* BL21-AI contenant le vecteur a été extrait et digéré avec les enzymes de restriction *XhoI* et *EcoRI* puis déposé sur gel d'agarose 0,8% (a). Pour chaque type de construction (Cter et Nter), l'insert d'un plasmide transformé a été purifié et séquencé. L'alignement des protéines prédites par le séquençage de ces inserts avec la séquence protéique de *PtaZFP2* est présenté (b).

peptides de synthèse. Des bactéries *E.coli* BL21-AI (inductible par l'arabinose) ont donc été transformées avec un vecteur pIX3.0 (Annexe 6) contenant la séquence de *PtaZFP2* additionnée de 6 Histidines en position C-terminale (Cter) ou N-terminale (Nter). La présence de l'insert dans les bactéries a été testée sur différentes lignées transformées par extraction de l'ADN plasmidique et digestion avec les enzymes de restriction *XhoI* et *EcoRI*. Ces enzymes coupent le vecteur pIX3.0 de part et d'autre de l'insert. La séquence codante de *PtaZFP2* a une taille de 597 pb (Martin *et al.*, 2009) et l'ajout des tag 6-Histidines entraîne la production de fragments d'ADN de 819 pb et 847 pb pour Cter et Nter respectivement (Figure 40). Le vecteur pIX3.0 ayant une taille de 2,7 kb (Annexe 6), la séparation sur gel d'agarose du produit de digestion par les enzymes *XhoI* et *EcoRI* montre la présence de bandes d'ADN aux tailles attendues pour les différentes souches d'*E.coli* testées (Figure 43a). Pour chaque construction (Cter et Nter), l'insert a été séquencé grâce aux amorces M13 présentes sur le vecteur pIX3.0. Les séquences en acides aminés prédites par les produits de séquençage obtenu ont été alignées avec la protéine *PtaZFP2* (Figure 43b). Dans les différentes constructions testées, la séquence protéique de *PtaZFP2* est bien conservée et on retrouve comme attendu la présence des 6 histidines en C-terminal ou en N-terminal. Cependant, le séquençage révèle la présence de la délétion de la boîte TATA au niveau du promoteur T7 dans la construction Cter (Annexe 7). Afin d'éviter tout problème de production de la protéine du fait de cette délétion, seule la construction possédant l'étiquette 6-His en position N-terminale de la protéine *PtaZFP2* a été conservée pour la suite de l'étude.

L'induction de la production de la protéine a alors été réalisée sur la souche d'*E.coli* transformée par la construction Nter. Les bactéries ont été prélevées à différents temps suivant l'induction par l'arabinose, culotées par centrifugation et les protéines ont été extraites par chauffage pendant 5 minutes à 95°C en présence de 100 µl de tampon SDS-PAGE 1X. Après dépôt de 10 µl de protéines totales et migration sur gel de polyacrylamide (12,5%), les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose. Comme le montre la coloration de la membrane de nitrocellulose au rouge ponceau, l'accumulation d'une protéine d'environ 25kDa est visible dès 30 min et jusqu'à 4h après l'ajout d'arabinose (Figure 44a et c). La protéine *PtaZFP2* a un poids moléculaire attendu d'environ 21 kDa et l'ajout des 6 histidines augmente ce poids moléculaire de 2,5 kDa. Pour vérifier que la

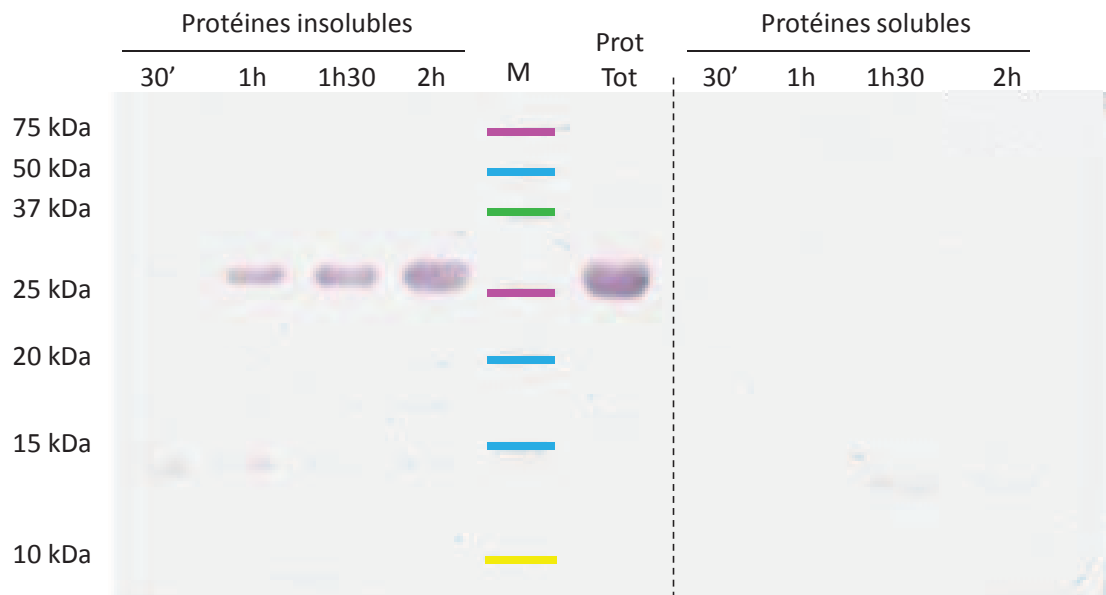


**Figure 44 : Cinétique d'induction de la production de la protéine PtaZFP2 par l'arabinose dans les bactéries *E.coli* BL21-AI.** L'accumulation de la protéine 6His-PtaZFP2 est suivie dans des extraits bactériens provenant de 1,5 mL de milieu de culture bactérienne prélevé à différents temps après l'ajout d'arabinose. Après migration de protéines totales sur gel d'acrylamide 12,5% et transfert sur membrane de nitrocellulose, les membranes sont colorées au rouge ponceau (a et c) et révélées par Western-Blot avec l'anticorps anti-Histidine dilué au 1/50 000<sup>ème</sup> (b) ou l'anticorps purifié anti-PtaZFP2 dilué au 1/1 000<sup>ème</sup> (d). (M=marqueur de taille).

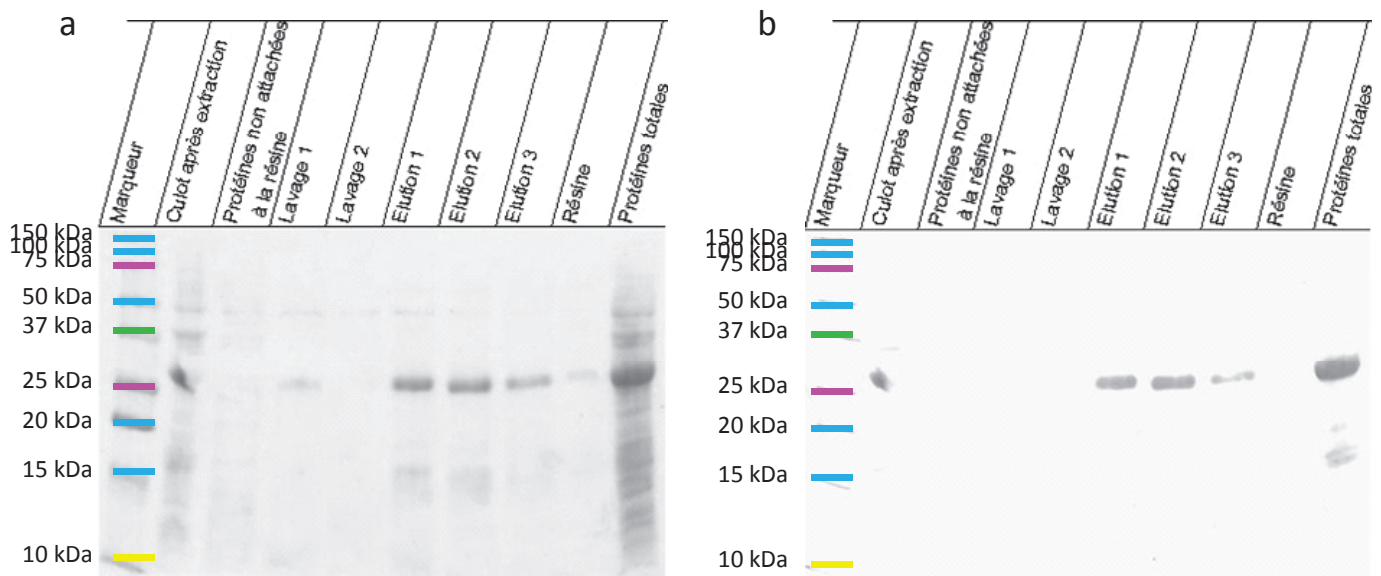
protéine de 25 kDa correspond à la production de PtaZFP2 associée aux 6-His en position N-terminale, nous avons dans un premier temps révélé la membrane de nitrocellulose avec un anticorps anti-6 histidines (1/50 000<sup>ème</sup>). De la même façon, dès 1h après l'induction par l'arabinose, on observe la détection d'une protéine de 25 kDa s'accumulant progressivement jusqu'à 4h après l'ajout d'arabinose (Figure 44b). Cette protéine de 25kDa ayant une taille très proche de la taille attendue et étant reconnue par l'anticorps reconnaissant les tags 6 histidines, correspond très probablement à la protéine PtaZFP2 marquée en N-terminal par l'étiquette 6-His. Deux bandes supplémentaires sont détectées par l'anticorps anti-Histidine au cours de la cinétique correspondant à des séquences peptidiques d'un poids moléculaire compris entre 15 et 20 kDa. Des protéines issues d'une cinétique d'induction similaire dans *E.coli* ont été déposées sur gel (figure 44c) et, après transfert sur membrane, ont été révélées en présence de l'anticorps anti-PtaZFP2. De la même façon que pour l'anticorps anti-6-His, l'anticorps anti-PtaZFP2 détecte la protéine de 25kDa s'accumulant dès 1h après l'ajout d'arabinose et ceci jusqu'à 5h après (Figure 44d). Là encore, l'anticorps anti-PtaZFP2 reconnaît les deux peptides de faible poids moléculaire (entre 15 et 20 kDa).

En conclusion, la protéine de 25 kDa produite en forte quantité dans *E.coli* après 1h d'induction par l'arabinose correspond bien à la protéine PtaZFP2 étiquetée en N-terminale par 6-His. Les peptides de faible poids moléculaire reconnus par les deux types d'anticorps pourraient correspondre à des produits de dégradation de cette protéine. Etant reconnus par l'anticorps anti-Histidine, ces résultats suggèrent que la partie C-terminale de la protéine serait plus sensible à la dégradation dans ces conditions. En plus de confirmer que la protéine de 25 kDa produite en *E.coli* correspond à la protéine PtaZFP2, ces données montrent que les anticorps anti-PtaZFP2 produits contre les peptides de synthèse sont capables de reconnaître la protéine entière en conditions dénaturantes et sont spécifiques de cette protéine au sein d'un extrait protéique bactérien.

Dans l'optique de réaliser des expériences de gel retard ultérieurement, nous avons testé si, après sonication, la protéine PtaZFP2 produite dans *E.coli* était soluble. Pour réaliser ces tests, nous avons en effet besoin que la protéine soit soluble. Comme le montre la Figure 45, on retrouve la protéine PtaZFP2 dans la fraction contenant les protéines insolubles. Pour tenter de contourner ce problème, nous avons testé différents milieux de culture (LB, TB = Terrific Broth, milieu riche et M9 = milieu minimum) et différentes températures de culture



**Figure 45 : Etude de la solubilité de la protéine PtaZFP2 produite dans *E.coli*.** Une cinétique d'induction de production de la protéine 6His-PtaZFP2 a été réalisée sur des cultures bactériennes en présence d'arabinose. Les cultures bactériennes ont été centrifugées et les culots de bactéries ont été lysés grâce à du tampon de lyse. Après sonication des extraits bactériens, les protéines solubles et insolubles ont été séparées par centrifugation. Les protéines ont été séparées par migration sur gel d'acrylamide 12,5%, transférées sur membrane et détectées par western-blot avec l'anticorps anti-PtaZFP2 dilué au 1/1 000<sup>ème</sup>. (M=marqueur de taille).



**Figure 46 : Purification de la protéine PtaZFP2 marquée 6-Histidines avec la résine Ni-Nta.** Après migration des protéines sur gel d'acrylamide 12,5%, la présence de la protéine 6His-PtaZFP2 dans les différentes fractions récoltées au cours de la purification des protéines sur une résine Ni-NTA est suivie soit par coloration de la membrane de nitrocellulose au rouge ponceau (a) soit par révélation Western-Blot avec l'anticorps purifié anti-PtaZFP2 dilué au 1/1 000<sup>ème</sup> (b).

(28°C et 37°C) mais dans tous les cas la protéine était insoluble (données non présentées). La protéine se trouve donc certainement dans des corps d'inclusion. Si des protéines PtaZFP2 se trouvent dans la fraction contenant les protéines solubles, elles sont en quantité inférieure au seuil de détection de l'anticorps.

Suite à ces résultats, nous avons cherché à purifier cette protéine en conditions dénaturantes dans le but de l'utiliser ensuite pour des tests d'interaction avec de l'ADN. Comme le montre la Figure 46, l'utilisation de la résine Ni-NTA fixant spécifiquement les protéines marquées 6 histidines, est efficace pour purifier la protéine PtaZFP2 quand ces protéines sont extraites en conditions dénaturantes. En effet si l'extrait de protéines totales est riche en protéines, les fractions d'élution ne semblent contenir qu'une protéine dont la taille correspond à la taille attendue (Figure 46a). De plus cette protéine est reconnue par l'anticorps anti-PtaZFP2 (Figure 46b). Les fractions d'élution issues de cette purification sur résine Ni-NTA semblent donc contenir la protéine PtaZFP2 marquée 6-Histidines purifiée, la première fraction d'élution étant la fraction la plus concentrée en protéines.

Finalement nous avons testé le seuil de détection de l'anticorps PtaZFP2 pour ces protéines produites dans *E.coli*. Pour cela, nous avons utilisé des extraits bactériens provenant de cultures induites pendant 4h et 5h par l'arabinose pour lesquels nous savons que la protéine est fortement accumulée. Les résultats montrent que l'anticorps possède une forte affinité pour la protéine PtaZFP2 puisqu'il est capable de détecter la protéine jusqu'à une dilution 1/20 000<sup>ème</sup> (Figure 47). Il faut cependant noter que, dans ces fractions, la quantité de protéine PtaZFP2 est importante.

La réactivité de l'anticorps purifié contre les peptides de synthèse avait été mesurée par l'entreprise Covalab grâce au test Elisa. Les peptides de synthèses ont été utilisés à des dilutions allant de 1000 ng.µL<sup>-1</sup> à 8 ng.µL<sup>-1</sup> et la réactivité de l'anticorps testée. On considère généralement qu'un anticorps possède une bonne réactivité à partir d'un titre (correspondant à la dernière dilution pour laquelle il y a une réaction avec l'anticorps) de 100 ng.mL<sup>-1</sup>. Le titre du peptide A est de 31 ng.mL<sup>-1</sup> et celui du peptide B est inférieur à 8 ng.mL<sup>-1</sup>, témoignant d'une forte réactivité de l'anticorps pour les peptides de synthèse.



**Figure 47 : Tests de la réactivité de l'anticorps anti-PtaZFP2 purifié envers la protéine 6-His PtaZFP2 produite dans *E.coli*.** Une quantité égale des fractions protéiques totales produites dans *E.coli* 4h après induction par l'arabinose a été déposée sur gel, transférée sur membrane et détectée avec l'anticorps anti-PtaZFP2 à différentes dilutions : 1/1 000, 1/2 000, 1/5 000, 1/10 000 et 1/20 000.



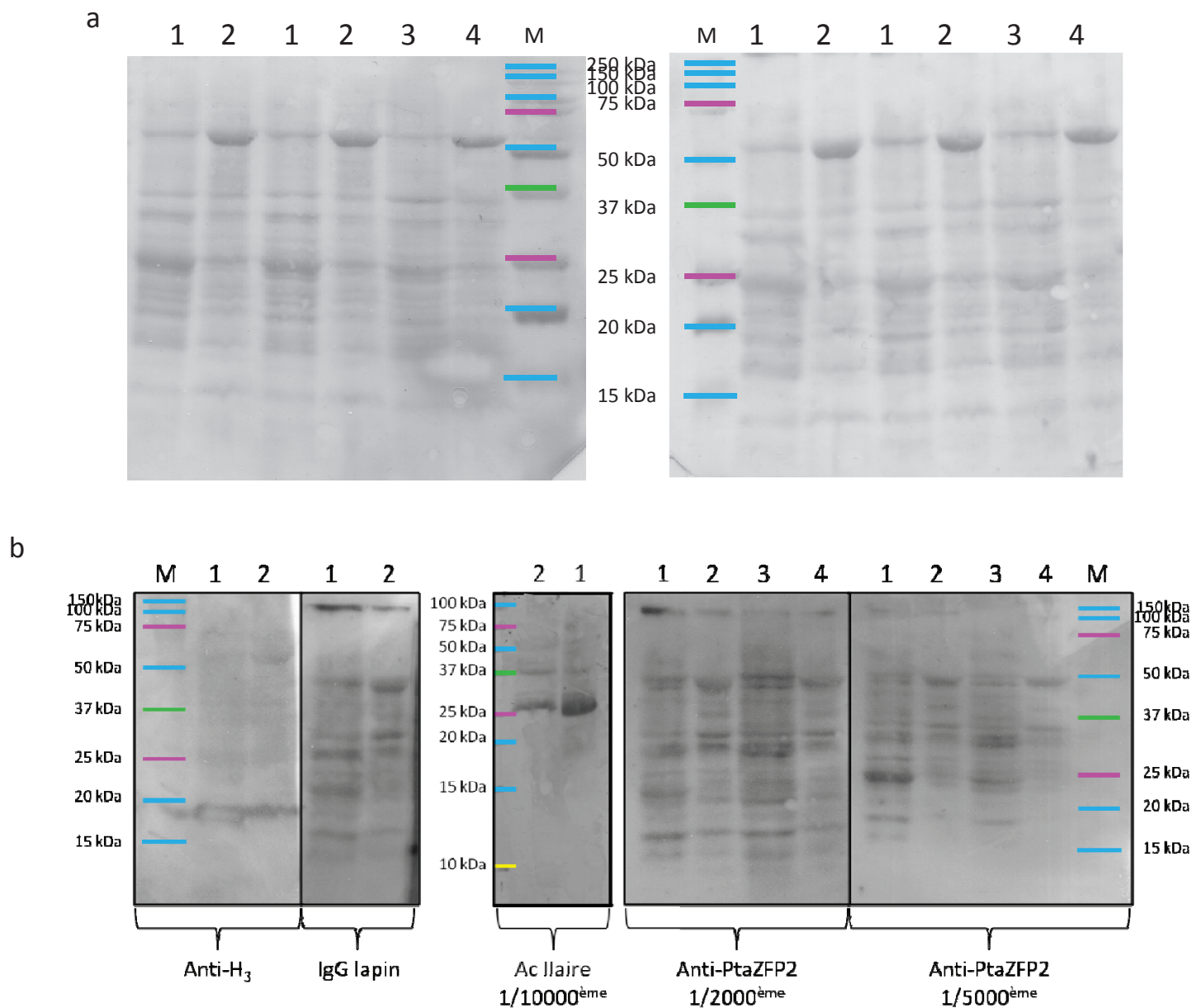
### 3. Etude de la protéine PtaZFP2 *in vivo*

#### a. Accumulation de la protéine *in vivo* suite à une stimulation mécanique : détection par western-blot

Pour mieux comprendre le rôle de PtaZFP2 dans la réponse de la plante au stress mécanique, il est important de connaître la cinétique d'accumulation de la protéine en condition témoin ou en réponse au stress mécanique. De plus, puisque les expériences d'agroinfiltrations n'ont pas été concluantes, nous avons utilisé un kit d'extraction de protéines permettant d'enrichir les fractions soit en protéines nucléaires, soit en protéines cytosoliques afin de conclure sur la localisation de la protéine. Dans un premier temps, nous avons testé deux conditions sur des feuilles de peuplier : des feuilles témoins et des feuilles blessées récoltées 30 min après le traitement (wounding). Pour chaque condition, nous avons utilisé : (i) un anticorps anti-histone H<sub>3</sub> afin de vérifier l'enrichissement des fractions en protéines nucléaires ou cytosoliques, (ii) des IgG de lapin testés en anticorps primaire comme témoins négatifs puisque l'anticorps anti-PtaZFP2 purifié a été produit chez le lapin, (iii) deux dilutions de l'anticorps anti-PtaZFP2 (1/2 000<sup>ème</sup> et 1/5 000<sup>ème</sup>) et (iv) l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin seul (dilution 1/10 000<sup>ème</sup>). Une coloration au rouge ponceau des membranes montre que les fractions enrichies en protéines nucléaires ou cytosoliques ne semblent pas avoir le même profil protéique (Figure 48a). Comme le montre la figure 48b, l'anticorps anti-Histone H<sub>3</sub> détecte une protéine d'une taille inférieure à 20 kDa pouvant correspondre à l'histone H<sub>3</sub> de peuplier et présente en plus grande quantité dans les fractions enrichies en protéines nucléaires que dans celles correspondant aux protéines cytosoliques, confirmant l'efficacité du kit d'extraction de protéines utilisé.

Des IgG de lapin ainsi que les anticorps secondaires seuls ont été utilisés dans ces expériences d'immunodétection comme témoins négatifs. Comme le montre la figure 48b, les IgG de lapin reconnaissent, dans les conditions testées, un grand nombre de protéines, certaines d'entre elles étant également reconnues par l'anticorps anti-PtaZFP2 (quelle que soit la dilution testée). Deux dilutions de l'anticorps spécifique anti-PtaZFP2 ont été testées : 1/2 000<sup>ème</sup> et 1/5 000<sup>ème</sup>. La dilution 1/2 000<sup>ème</sup> de l'anticorps ne permet pas de détecter de profil protéique particulier et le marquage aspécifique est fort. En revanche, pour l'anticorps

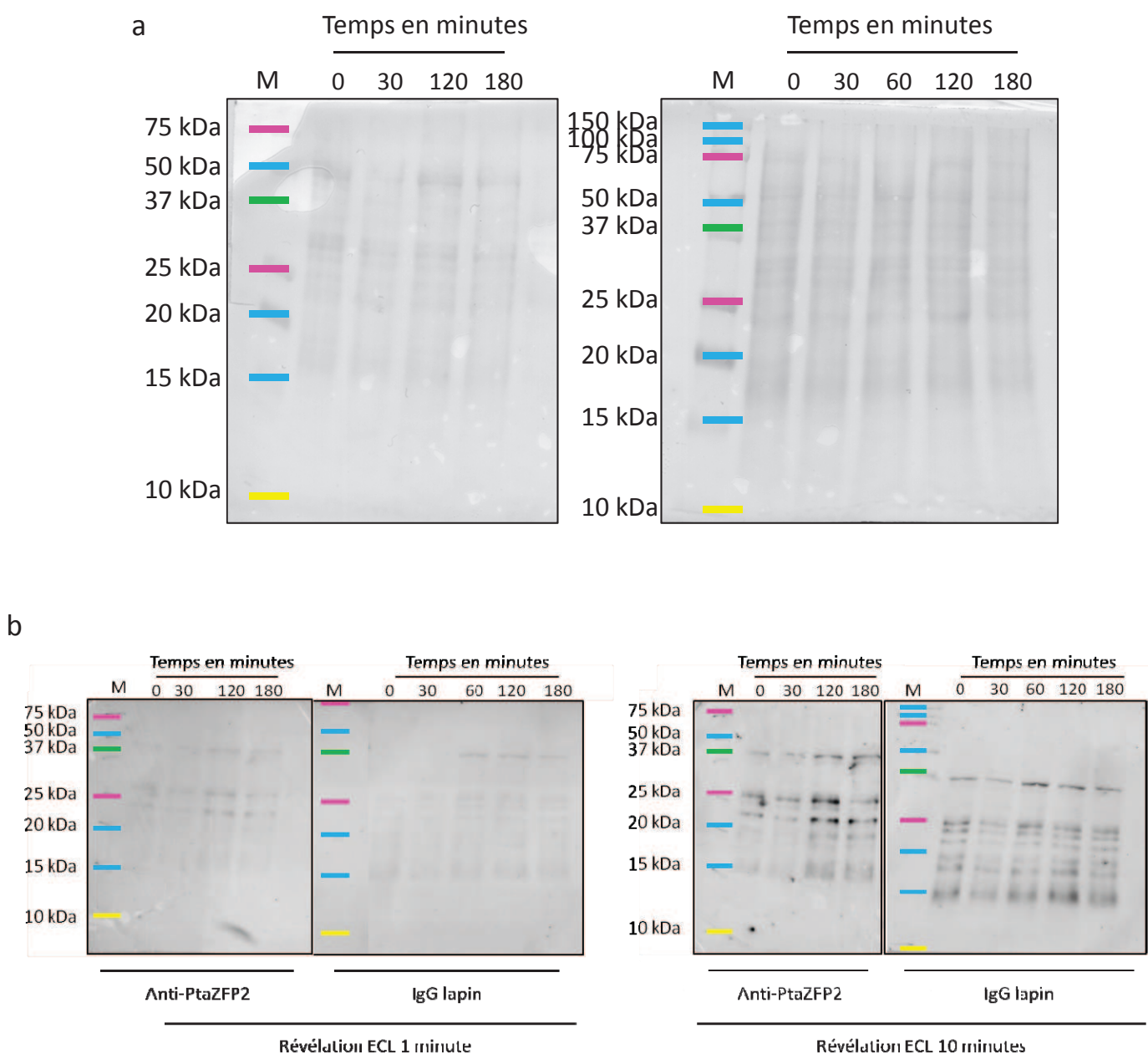




**Figure 48 : Accumulation de la protéine PtaZFP2 en réponse à la blessure dans des feuilles de peuplier (*Populus tremula x alba*).** L'accumulation de la protéine est suivie dans 40  $\mu\text{g}$  de protéines des fractions protéiques enrichies en protéines nucléaires (1 et 3) ou en protéines cytosoliques (2 et 4) provenant de feuilles témoins (1 et 2) ou blessées (3 et 4). Après migration des protéines sur gel d'acrylamide 12,5 % et transfert sur membrane, les membranes ont été colorées au rouge ponceau (a) et révélées par Western-Blot avec l'anticorps anti-Histone H<sub>3</sub> (1/1 000<sup>ème</sup>), des IgG de lapin (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 1/1 000<sup>ème</sup>), l'anticorps secondaire seul (1/10 000<sup>ème</sup>) ou avec l'anticorps purifié anti-PtaZFP2 (1/2 000<sup>ème</sup> ou 1/5 000<sup>ème</sup>) (b). (M=marqueur de taille).

dilué au 1/5000<sup>ème</sup>, une bande plus intense dans les fractions enrichies en protéines nucléaires est observée à la taille attendue (25 kDa). Cette bande est également plus intense dans les extraits protéiques des feuilles témoins par rapport aux feuilles blessées. Cependant, des protéines de taille similaire sont reconnues à la fois par l'anticorps secondaire seul et les IgG de lapin. Les différents anticorps sont probablement utilisés à des concentrations trop fortes et réagissent de façon non spécifique. Il est donc difficile de conclure si la bande observée avec l'anticorps primaire anti-PtaZFP2 est bien la protéine PtaZFP2 ou est plutôt le résultat d'une fixation aspécifique.

Pour améliorer les conditions d'immunodétection, nous avons fait varier les concentrations en anticorps primaires et secondaires (jusqu'à respectivement 1/10 000<sup>ème</sup> et 1/30 000<sup>ème</sup>), les temps d'incubation en présence de l'anticorps primaire (nous sommes passés de 1 nuit à 4°C à 2h à température ambiante) et les temps d'exposition sur film autoradiographique après révélation ECL (1 minutes, 5 minutes ou 10 minutes). Nous avons ainsi réussi à définir des conditions améliorant la détection de la protéine PtaZFP2. La Figure 49 présente le résultat d'une immunodétection réalisée sur des fractions enrichies en protéines nucléaires de tiges de peuplier fléchies prélevées selon une cinétique allant de 0 à 180 minutes après la flexion. Dans ces conditions, les IgG de lapin reconnaissent un nombre plus faible de protéines qu'auparavant. Avec l'anticorps anti-PtaZFP2, deux protéines d'une taille supérieure à 20 kDa et de 25 kDa respectivement sont détectées et s'accumulent à un taux plus élevé dans les tiges au temps 120 minutes après une flexion (Figure 49b). L'accumulation de ces bandes n'est pas observée avec les IgG de lapin ; au contraire les dépôts protéiques semblent relativement équivalents dans chaque puits comme le montre la coloration de la membrane au rouge ponceau (Figure 49a). Ces deux bandes pourraient donc correspondre à une détection spécifique de la protéine PtaZFP2. Avec un temps d'exposition des membranes sur le film autoradiographique fixé à 1 minute, le marquage aspécifique est fortement atténué et ces deux bandes correspondent aux protéines majoritairement reconnues par l'anticorps anti-PtaZFP2 (Figure 49b). Lorsque le temps d'exposition des membranes est augmenté à 10 minutes, le marquage aspécifique augmente, mais le marquage de ces deux protéines est plus intense dans les protéines nucléaires de tiges prélevées 120 min après une flexion. Les fractions cytosoliques de ces extraits protéiques n'étaient pas suffisamment concentrées pour pouvoir les tester dans les



**Figure 49 : Accumulation de la protéine PtaZFP2 en réponse à la flexion de la tige de peuplier (*Populus tremula x alba*).** L'accumulation de la protéine est suivie dans des fractions protéiques enrichies en protéines nucléaires provenant de tiges de peuplier récoltées 0, 30, 60, 120 ou 180 minutes après une flexion. Après migration de 46 µg de protéines sur gel d'acrylamide 12,5% et transfert sur membrane, les membranes ont été colorées au rouge ponceau (a) et révélées par Western-Blot avec l'anticorps purifié anti-PtaZFP2 (1/10 000<sup>ème</sup>) ou des IgG de lapin (100 µg.mL<sup>-1</sup>) et avec différents temps de révélation ECL (1 ou 10 minutes) (b). (M=marqueur de taille).

mêmes conditions que les protéines nucléaires. En revanche, aucune protéine s'accumulant de manière particulière n'a été détectée lorsque des extraits contenant 20 µg de protéines cytosoliques ont été testés.

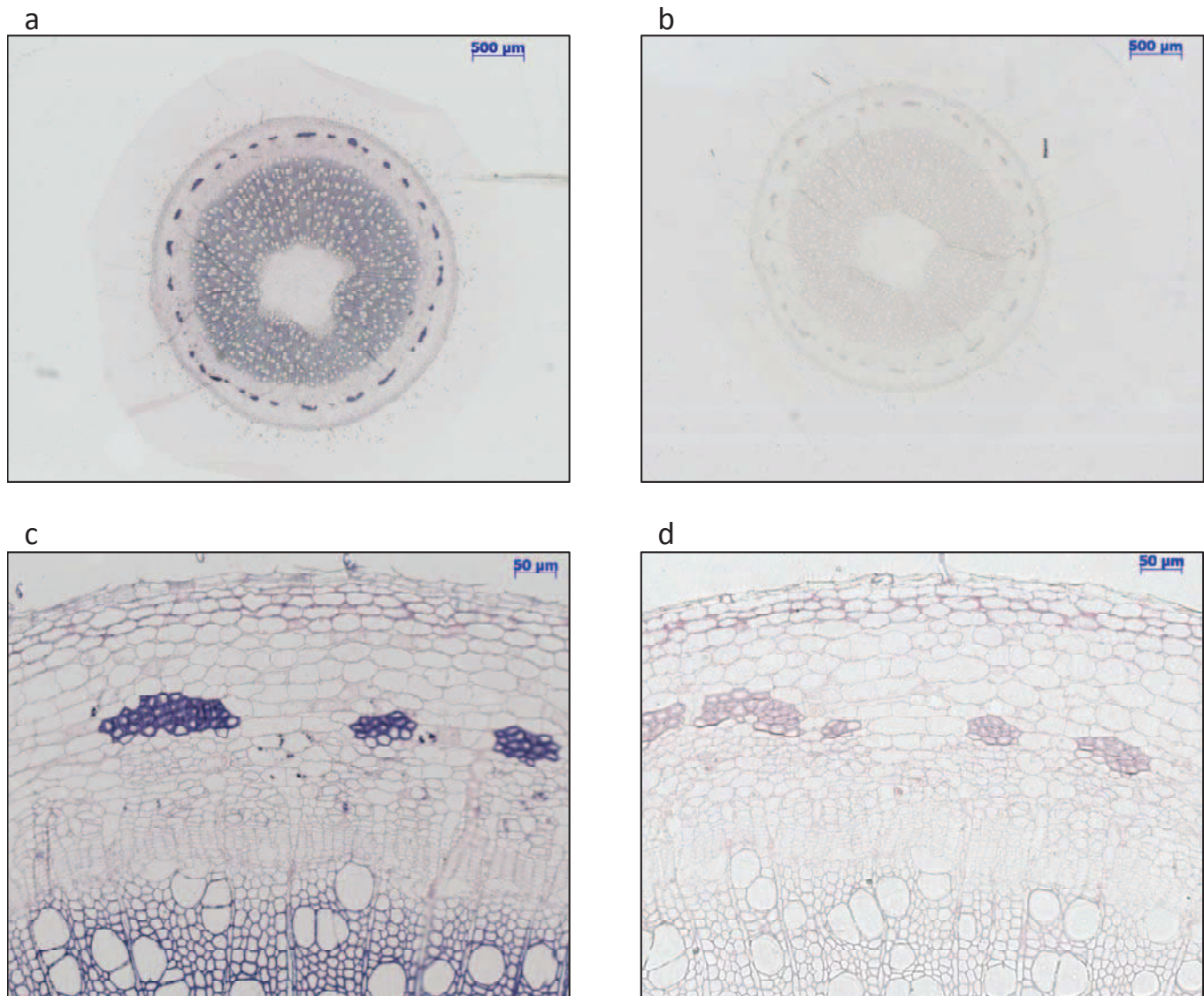
**b. Localisation tissulaire de PtaZFP2 : immunolocalisation**

Toujours dans le but de mieux comprendre le rôle de PtaZFP2 dans la réponse au stress mécanique, nous avons tenté de localiser la protéine au niveau tissulaire. Sa localisation au sein de la plante pourrait nous donner des renseignements sur son rôle et sur la thigmomorphogenèse plus généralement : existe-t-il dans la tige des tissus mécanopercepteurs répondant plus spécifiquement à la sollicitation ? Au cours du phénomène d'accommodation, est-ce que tous les tissus (*i.e* ceux déjà en place au moment de la première sollicitation ou ceux formés entre les sollicitations successives) répondent de la même manière à une deuxième sollicitation ?

Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'immunolocalisation avec l'anticorps anti-PtaZFP2 sur des tiges de peuplier récoltées 30 minutes après une flexion. Le temps 30 minutes a été choisi par rapport à la cinétique d'accumulation des transcrits de PtaZFP2 (Martin *et al.*, 2009). Différentes dilutions de l'anticorps ont été testées : 1/250<sup>ème</sup>, 1/500<sup>ème</sup>, 1/1000<sup>ème</sup>. Les mêmes dilutions de sérum pré-immun ont été testées en témoin négatif. L'anticorps secondaire (sans utilisation de l'anticorps primaire) a également été testé en témoin négatif. Une coloration a été observée après 2 minutes de révélation dans le cas du pré-immun 1/250<sup>ème</sup>, aucune coloration n'est observée avec l'anticorps spécifique à la même dilution même au bout d'une heure de révélation. Aucun signal n'est visible en présence de l'anticorps secondaire seul (sans anticorps primaire), démontrant que la coloration aspécifique observée avec le pré-immun n'est pas due à une fixation aspécifique de l'anticorps secondaire (résultats non présentés).

Face à ces premiers résultats, un nouveau test a été réalisé avec seulement la dilution de l'anticorps au 1/250<sup>ème</sup> (sérum pré-immun et anticorps anti-PtaZFP2) mais en testant différents temps de révélation : 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 55 minutes, 1h, 1h15, 2h, 2h30 et une nuit. Dès 2 minutes après l'ajout du substrat, la coloration commence à apparaître pour le pré-immun en particulier au niveau des fibres de sclérenchyme. A 5 minutes, une





**Figure 50 : Immunolocalisation de PtaZFP2 sur des sections de tiges de peuplier fléchies.** Les portions de tiges fléchies ont été prélevées 30 minutes après la flexion de la tige. Après inclusion en résine, des coupes transversales ont été réalisées. Les immunodétections ont été réalisées avec du sérum pré-immun (dilution 1/250<sup>ème</sup>, témoin négatif, a et c) ou avec l'anticorps anti-PtaZFP2 (dilution 1/250<sup>ème</sup>, b et d). Les observations ont été réalisées après 2h de révélation, sous microscope optique.

coloration intense est observée pour le pré-immun au niveau des fibres du sclérenchyme (parois), des grains d'amidon, de quelques cellules dans le phloème et des rayons xylémiens. En revanche, pour l'anticorps spécifique, aucun marquage n'est visible même au bout d'une nuit de révélation. La Figure 50 présente les observations réalisées au bout de 2h de révélation.

Il est important de noter que ces expériences ont été réalisées alors que les conditions d'immunodétection de la protéine PtaZFP2 par western-lot n'avaient pas encore été améliorées. Le temps de prélèvement des tiges testé (30 min après la flexion) n'est probablement pas optimal pour détecter la protéine. De plus, dans ces expériences, les anticorps secondaires sont couplés à la phosphatase alcaline alors que dans les immunodétections par Western-blot, les anticorps secondaires sont couplés à la HRP et révélés par ECL, système de révélation plus sensible.



## D. Discussion

### 1. Localisation sub-cellulaire de la protéine

Afin d'étudier la localisation subcellulaire de la protéine PtaZFP2, nous avons réalisé des tests d'agroinfiltration sur feuilles de tabac avec des constructions contenant la protéine en fusion avec la GFP. Les résultats obtenus par cette technique montrent que la protéine de fusion est localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules transformées. Le transport de la protéine de fusion vers le noyau pouvant prendre du temps, une cinétique a été testée : plusieurs plants de tabac ont été agroinfiltrés et des observations ont été réalisées tous les jours pendant 10 jours. Même dans ces conditions, la localisation de la protéine de fusion GFP-PtaZFP2 est observée dans ces deux compartiments cellulaires. Ces résultats amènent à se poser des questions quant à la localisation réelle de cette protéine *in vivo*. La GFP produite dans ces constructions correspond à une protéine de 27 kDa. Comme les protéines de taille inférieure à 50 kDa, elle peut diffuser librement à travers les pores nucléaires et se retrouver aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau : c'est ce qui est observé dans nos expériences avec le vecteur vide 2CA produisant uniquement la GFP. Or, la protéine PtaZFP2 a un poids moléculaire estimé à un peu plus de 21 kDa ; ainsi le poids moléculaire de la protéine de fusion atteint tout juste 50 kDa et la localisation nucléaire détectée dans les tests d'agroinfiltration pourrait être due à une diffusion libre de cette protéine à travers les pores nucléaires. Pourtant, une approche identique a été réalisée auparavant pour plusieurs Q-type C2H2-ZFPs de différentes espèces, indiquant clairement une localisation nucléaire de ces protéines (Kim *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2004). Le signal de localisation nucléaire de PtaZFP2 n'est peut être pas assez fort pour contrer le phénomène de diffusion passive. Plusieurs solutions peuvent être envisagées pour résoudre ce problème. Face au problème de diffusion, certaines études proposent l'utilisation d'homo-multimères de la GFP (6xGFP) afin de limiter la diffusion dû à la petite taille de la GFP (Genové *et al.*, 2005; Seibel *et al.*, 2007). Nous pourrions également comparer l'intensité du signal fluorescent au niveau du noyau en microscopie confocale entre la construction produisant la GFP seule et celle produisant la protéine de fusion GFP-PtaZFP2. Face à cette





double localisation observée dans le cas du facteur de transcription de type bHLH chez le tabac, Kodama et Sano (2006) ont eux préféré réaliser des immunodétections sur les différentes fractions cellulaires (cytoplasme, mitochondries et chloroplastes), ce qui leur a permis de conclure sur la localisation chloroplastique de cette protéine. C'est ce que nous avons voulu tester en réalisant des extractions protéiques enrichies en protéines de noyau sur des feuilles de peuplier blessées ou des tiges fléchies. Les résultats de ces immunodétections sont préliminaires mais l'anticorps purifié anti-PtaZFP2 semble reconnaître plus spécifiquement une protéine d'une taille correcte dans la fraction nucléaire de tiges de peuplier et en particulier 2h après une flexion de la tige. Malgré plusieurs mises au point jouant sur la saturation de la membrane, les dilutions des anticorps et le système de révélation, des améliorations peuvent être apportées à ces expériences d'immunodétection sur : (i) la pureté de l'extrait contenant les protéines nucléaires et (ii) la spécificité du marquage en augmentant la dilution de l'anticorps.

Au cours de ce travail de thèse, la présence des protéines PtaZFP2 dans la fraction protéique cytosolique des tiges fléchies n'a pas été testée par immunodétection par manque de temps. Il faut cependant garder à l'esprit que certains facteurs de transcription peuvent être détectés à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Leur activité en tant que facteur de transcription peut alors être modulée par des modifications post-traductionnelles qui régulent leur localisation cellulaire. Chez les animaux par exemple, ce sont principalement des phosphorylations (au niveau du NLS – signal de localisation nucléaire) qui permettent le transport actif des protéines de type C2H2 vers le noyau (Zhang *et al.*, 2000; Dominguez *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005; Mingot *et al.*, 2009). Une analyse par le logiciel WoLF PSORT de prédiction de localisation cellulaire, a révélé deux NLS sur la protéine PtaZFP2 situés à l'extrémité C-terminale de chaque doigt de zinc. Ces NLS pourraient donc jouer un rôle important dans la régulation de la localisation de PtaZFP2 et donc dans son rôle de facteur de transcription. Par ailleurs, lors des tests d'agroinfiltration, aucun stress mécanique n'a été appliqué sur les feuilles agroinfiltrées. Il pourrait donc être intéressant de tester si l'application d'un stress mécanique sur les feuilles agroinfiltrées modifie la localisation subcellulaire de PtaZFP2.

Enfin, il est difficile d'expliquer pourquoi nous n'avons pas été capables de détecter de fluorescence pour les agroinfiltrations réalisées avec le vecteur 2NA. Il est possible que la



structure tridimensionnelle de la protéine de fusion gène par sa conformation la fluorescence de la GFP. Mais cette hypothèse n'explique pas pourquoi aucun signal n'a été détecté avec la GFP seule. Il avait déjà été noté par Chakrabarty et ses collaborateurs (2007) que les vecteurs CA montraient une meilleure efficacité que les vecteurs NA (70% vs 96,5%). Les auteurs conseillaient néanmoins de tester les deux constructions.

## 2. Production de la protéine dans *E.coli*

120

Nous avons réussi à produire la protéine PtaZFP2 dans *E.coli* et à la purifier. Toutefois, malgré plusieurs tests, cette protéine n'a pu être purifiée que dans des conditions dénaturantes du fait de son agrégation dans des corps d'inclusion. Le premier objectif était d'utiliser cette protéine, produite en conditions hétérologues, afin de tester sa capacité de se lier à l'ADN par la technique du gel retard. Pour cela, il faut connaître la séquence du fragment d'ADN que l'on veut tester. Certaines études ont montré que les protéines à deux doigts de zinc de type C2H2 contenant la séquence consensus QALGGH présentaient une affinité pour de courtes séquences d'ADN de type AGT présentes sur les promoteurs des gènes cibles (Takatsuji and Matsumoto, 1996; Yoshioka *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2004). En particulier, Yoshioka et ses collaborateurs (2001) ont montré que la protéine ZPT2-2 de pétunia interagit avec deux types de séquences d'ADN. L'interaction du 2<sup>ème</sup> doigt de zinc (en C-terminal) avec un site CAGT initie la liaison, puis le 1<sup>er</sup> doigt de zinc (en N-terminal) interagit avec un site AGC(T) localisé quelques nucléotides soit en amont, soit en aval du site CAGT, stabilisant ainsi le complexe. Cette liaison à l'ADN dépend donc de la distance entre les sites de liaison sur les promoteurs des gènes cibles mais également de la distance entre les deux doigts de zinc sur la protéine. Chez *Arabidopsis thaliana*, des expériences de retard sur gel ont montré l'interaction de 4 Q-type C2H2-ZFPs (AZF1-3, STZ) avec des oligonucléotides contenant des séquences A(G/C)T répétées en tandem et séparées de quelques nucléotides. Il serait donc intéressant de tester l'affinité de PtaZFP2 pour de tels oligonucléotides. En revanche, on peut se demander si les protéines purifiées en conditions dénaturantes, comme c'est le cas de la protéine 6His-PtaZFP2, sont capables d'interagir avec l'ADN. Dans les deux expériences citées, les protéines testées avaient également été



produites dans *E.coli* (Yoshioka *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2004). De plus, des protéines tronquées de pétunia, contenant chacune un seul doigt de zinc, présentent une liaison à l'ADN à condition de tester cette liaison dans un milieu contenant du zinc, afin de reconstituer la liaison avec l'atome de zinc (Yoshioka *et al.*, 2001). A court terme, dans le but de démontrer l'activité de facteur de transcription de PtaZFP2, il serait donc intéressant de tester l'affinité de la protéine recombinante 6His-PtaZFP2 pour de tels oligonucléotides et dans de telles conditions.

### 3. Etude de la protéine *in vivo*

Afin d'étudier l'accumulation et la stabilité de la protéine PtaZFP2 suite à une sollicitation mécanique *in vivo*, nous avons fait produire des anticorps polyclonaux dirigés contre des peptides de synthèse localisés dans des régions spécifiques de la protéine PtaZFP2. Ces anticorps présentent une bonne spécificité contre la protéine recombinante produite dans *E.coli* et une bonne réactivité à la fois contre cette protéine et contre les peptides de synthèse. Nous avons donc utilisé ces anticorps lors de western-blot sur des fractions protéiques provenant de feuilles ou de tiges de peuplier.

Les premiers tests ont été réalisés sur des feuilles blessées prélevées 30 min après incision du limbe pour deux raisons : (i) ces conditions permettaient d'extraire une grande quantité de protéines à partir d'un nombre de plantes réduit et (ii) ce stress mécanique induit très fortement l'expression de *PtaZFP2* 30 minutes après le stress (Martin *et al.*, 2009; Gourcilleau *et al.*, soumis). Le but était ainsi d'avoir une réponse claire et contrastée, avec une forte production de la protéine. Alors que les ARNs de *PtaZFP2* s'accumulent très fortement 30 minutes après la blessure de la feuille, nous n'avons pas constaté d'accumulation de la protéine à ce temps de cinétique dans les conditions testées. Toutefois, ces premiers tests nous ont permis de réduire progressivement les marquages aspécifiques révélés par les différents anticorps utilisés au cours du western-blot.

Dans un deuxième temps, nous avons testé la cinétique de l'accumulation de la protéine PtaZFP2 en réponse à une flexion de la tige. L'amélioration des conditions de détection nous a permis de constater l'accumulation de deux protéines au cours de la



cinétique : une protéine d'environ 20 kDa et une autre d'environ 25 kDa. Si la première protéine pourrait correspondre à la taille prédite à partir de la séquence en acides aminés de PtaZFP2 (environ 21 kDa), la seconde pourrait correspondre à la protéine PtaZFP2 ayant subi des modifications post-traductionnelles (glycosylation, phosphorylation...). Il a déjà été montré, chez l'homme et la souris, la présence de multiples sites de phosphorylation chez une ZFP (Saotome *et al.*, 1995). L'analyse de la séquence protéique de PtaZFP2 par un logiciel de recherche de sites de phosphorylation (NetPhos 2.0) prédit 9 sites de phosphorylation sérine et 1 site thréonine. Ces modifications post-traductionnelles pourraient ainsi être un moyen de réguler l'activité de la protéine. Ces résultats suggèrent également que l'accumulation maximale de la protéine est plutôt tardive (2h) par rapport au temps d'accumulation maximale des transcrits du gène après flexion de la tige (30 minutes). Bien que la protéine semble avoir un niveau de base (elle est présente en condition témoin), son accumulation en réponse à la sollicitation mécanique semble transitoire : la quantité de protéines revient à son niveau de base dès 3h après la sollicitation.

Toutefois, il faut confirmer que les bandes observées correspondent bien à PtaZFP2. Pour cela, les conditions de détection par Western-blot doivent encore être améliorées en diminuant de nouveau la concentration en anticorps primaire par exemple. Il serait intéressant de tester si ces protéines ne sont plus détectées lorsqu'on utilise l'anticorps anti-PtaZFP2 préalablement incubé en présence des peptides de synthèse. Finalement, les protéines pourraient être séparées par migration bi-dimensionnelle en vue d'un séquençage partiel. Ce séquençage est le seul moyen de s'assurer que ces bandes sont bien dues à une réaction spécifique de l'anticorps avec PtaZFP2 et non à un marquage aspécifique.

Si ces résultats se confirment, il sera alors intéressant de tester une cinétique d'accumulation de la protéine PtaZFP2 plus longue et de tester sa production en réponse à des flexions répétées pour étudier son rôle lors des phénomènes d'accommodation.

#### *4. Localisation tissulaire de la protéine*

Nous n'avons pas été en mesure de répondre à la question de la localisation tissulaire de PtaZFP2 au cours des expériences d'immunolocalisation réalisées sur des coupes





transversales de tiges de peuplier fléchies. En premier lieu, une réaction aspécifique du sérum pré-immun amène à une coloration intense et rapide des coupes qui gêne l'analyse des résultats. Cette réaction aspécifique du sérum pré-immun avait également été observée en Western Blot et nous avons tenté de résoudre ce problème en utilisant des IgG de lapin en tant que témoin négatif. Toutefois, les IgG de lapin engendrent également le marquage aspécifique d'un nombre important de protéines dans les extraits protéiques de peuplier. D'autre part, aucune coloration n'a pu être observée avec les anticorps anti-PtaZFP2, même à de faibles dilutions ( $1/250^{\text{ème}}$ ) et avec des temps d'incubation importants. Dans les expériences de Western Blot, une quantité importante de protéines nucléaires totales (40 à 50  $\mu\text{g}$ ) doit être déposée pour pouvoir détecter un signal. De plus, aucun signal n'avait pu être détecté en western-blot lorsque l'anticorps secondaire utilisé était couplé à la phosphatase alcaline. Ces résultats suggèrent que la protéine PtaZFP2 est probablement faiblement produite *in vivo*. Et en effet, si la protéine est difficile à détecter sur un échantillon de protéines provenant de 2g de tige, la probabilité de pouvoir la détecter sur une coupe de tige doit être faible. De plus, si la protéine PtaZFP2 est réellement une protéine nucléaire, les coupes étudiées doivent passer par le noyau pour permettre son observation. Pourtant, chez les animaux, des immunolocalisations ont déjà été réalisées avec succès pour des protéines de type C2H2 (Wang *et al.*, 1997; Chiambaretta *et al.*, 2004). Des facteurs de transcription de plantes ont également pu être détectés par immunolocalisation (Zachgo *et al.*, 1995). Il faudrait donc se placer au moment où la protéine s'exprime le plus, c'est-à-dire environ 2 heures après la sollicitation mécanique d'après les résultats obtenus en western-blot. De plus, des approches permettant d'augmenter la sensibilité de la révélation pourraient être envisagées.



## E. Conclusion

Cette étude ne nous a pas permis de conclure quant à la localisation cellulaire de la protéine. Il faut maintenant réfléchir aux techniques à mettre en œuvre pour nous permettre de déterminer si cette C2H2-ZFPs est bien une protéine nucléaire. Si ce n'est pas le cas, ceci amènerait à se poser des questions sur la fonction réelle de PtaZFP2. Au moins deux possibilités s'offrent à nous : rechercher la localisation de la protéine dans des feuilles agroinfiltrées soumises à du wounding afin de tester une possible re-localisation cellulaire en réponse à la sollicitation mécanique, ou utiliser un vecteur 6xGFP afin d'augmenter la taille de la protéine de fusion et de limiter la diffusion passive à travers les pores nucléaires.

Cependant, l'étude de la protéine *in vivo* semble montrer que les fractions enrichies en protéines nucléaires accumulent plus de PtaZFP2 que les fractions solubles cytosoliques. Une première cinétique d'accumulation de la protéine en réponse à la flexion a été montrée et il semblerait que la protéine s'accumule transitoirement 2h après la flexion de la tige de peuplier. Il faut toutefois améliorer les conditions de détection de la protéine, vérifier cette cinétique d'accumulation que nous avons observée au cours des premiers tests et tester l'accumulation de la protéine en réponse à plusieurs sollicitations mécaniques.

Des anticorps dirigés contre PtaZFP2 ont été produits et nous avons réussi à produire la protéine dans *E.coli*. Nous possédons donc maintenant des outils moléculaires importants qui nous permettront d'étudier les interactions de la protéine à l'ADN grâce aux techniques du retard sur gel ou du CHIP si les anticorps s'avèrent reconnaître spécifiquement la protéine afin de caractériser les liens directs entre la protéine PtaZFP2 et les gènes cibles de ce facteur de transcription.



*Discussion générale et  
Perspectives*



Le but de ce travail de thèse était de caractériser chez le peuplier la voie de réponse au stress mécanique impliquant le gène *PtaZFP2*. En effet, si les réponses physiologiques à la mécanoperception sont assez bien décrites, les voies moléculaires de cette thigmomorphogenèse restent floues. Des molécules et des gènes ont déjà été caractérisés comme étant impliqués dans cette réponse (Telewski, 2006; Chehab *et al.*, 2009), mais le dessin précis de cette voie de signalisation reste à établir. Afin de tenter de mieux caractériser cette voie, nous nous sommes appuyés sur un gène mécanosensible identifié et caractérisé au laboratoire : *PtaZFP2*. Sachant que ce gène appartient à la voie de réponse à une sollicitation mécanique de type flexion chez le peuplier, nous avons étudié sa régulation d'une part, et les caractéristiques de sa protéine d'autre part, afin d'apporter des éléments de réponse quant à la cascade de réponses se déroulant entre la perception d'un signal mécanique et les modifications physiologiques observées.

## *A. Que se passe-t-il en amont de PtaZFP2 lors d'une sollicitation mécanique: la régulation du gène*

### *1. La réponse au stress mécanique au niveau cellulaire*

Un modèle de mécanoperception a été établi au laboratoire : la variable mécanoperçue par la cellule serait la déformation de sa membrane plasmique et, au sein d'un tissu, l'intensité de la sollicitation mécanique correspondrait à la somme des déformations perçues par les cellules déformées de ce tissu (Coutand and Moulia, 2000). Ainsi, chaque cellule émettrait un signal proportionnel à la déformation perçue et, au sein d'un tissu, le signal émis serait la somme des signaux émis par les cellules déformées. Cette hypothèse a déjà été vérifiée au niveau tissulaire *via* l'application d'une flexion contrôlée de la tige de peuplier couplée à l'étude de l'expression du gène mécanosensible *PtaZFP2* (Coutand *et al.*, 2009) mais cela restait à vérifier au niveau cellulaire. Nous avons donc





cherché à appliquer une sollicitation mécanique contrôlée sur des cellules de peuplier et à étudier ensuite l'expression de ce même gène en réponse à la sollicitation.

Nous avons, dans un premier temps, réalisé une sollicitation par compression de gel d'agarose dans lequel étaient incluses des cellules de peuplier, qui nous permettait de suivre par analyse d'images la déformation subie par les cellules au cours de l'application du stress. Cependant, ce protocole ne nous a pas permis de réaliser les analyses moléculaires nécessaires à l'étude de l'expression du gène pour caractériser l'intensité de la réponse.

Comme le montrent les résultats présentés dans le deuxième chapitre, nous avons ensuite réalisé une sollicitation en augmentant la vitesse de l'agitation rotative des cultures cellulaires. Des études antérieures avaient déjà montré que ce type de sollicitation pouvait déclencher l'expression d'un gène dans des cultures cellulaires de peuplier (Lee *et al.*, 2005). Nous avons montré que cette vitesse d'agitation rapide des cultures cellulaires amenait à l'induction de l'expression du gène mécanosensible *PtaZFP2*. La cinétique d'induction du gène est d'ailleurs comparable à celle observée en réponse à une flexion transitoire de la tige de peuplier (Martin *et al.*, 2009) : induction dès 15 minutes, maximum d'accumulation après 30 minutes puis retour progressif au niveau d'expression de base du gène. Or, au cours de l'application de flexions répétées de la tige, espacées de 24h chez le peuplier, il a été observé que la réponse de croissance ainsi que l'induction du gène *PtaZFP2* sont moins importantes pour des flexions répétées que pour une flexion unique (Martin *et al.*, 2010). Ces résultats pourraient s'expliquer par un phénomène d'accommodation que nous définissons comme étant une désensibilisation des cellules au stress mécanique. Au niveau des cultures cellulaires, la sollicitation mécanique (agitation) était maintenue au cours de la cinétique de prélèvement, et pourtant l'accumulation des transcrits de *PtaZFP2* est transitoire. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats : soit les réponses déclenchées suite à la stimulation produisent des répresseurs capables d'inhiber rapidement les réponses précoces, soit un phénomène d'accommodation à la sollicitation mécanique se met en place en jouant sur la quantité ou la sensibilité des récepteurs mécanosensibles. La modification de la vitesse d'agitation est perçue comme un stress pendant un certain laps de temps, puis il y a accommodation des cellules. Plusieurs canaux mécanosensibles sont maintenant identifiés chez *Arabidopsis thaliana* : les canaux de type MSL (Haswell and Meyerowitz, 2006; Haswell *et al.*, 2008; Peyronnet *et al.*, 2008) ou les canaux MCA



(Nakagawa *et al.*, 2007; Yamanaka *et al.*, 2010). A ce jour, le rôle exact de ces canaux mécanosensibles n'est pas connu. Par exemple, des quintuples mutants d'*Arabidopsis thaliana* pour 5 gènes codant différents MSL n'ont pas de phénotype particulier (Jean-Marie Frachisse, communication personnelle). L'étude du phénomène d'accommodation pourrait passer par l'étude du comportement de ces différents types de canaux (niveau d'accumulation de ces protéines au cours de sollicitations mécaniques répétées, temps de relaxation des canaux...). Une autre approche intéressante serait d'étudier la fluidité membranaire autour des canaux mécanosensibles, une telle modification pourrait en effet moduler la capacité d'ouverture de ces canaux « *stretch-activated* ».

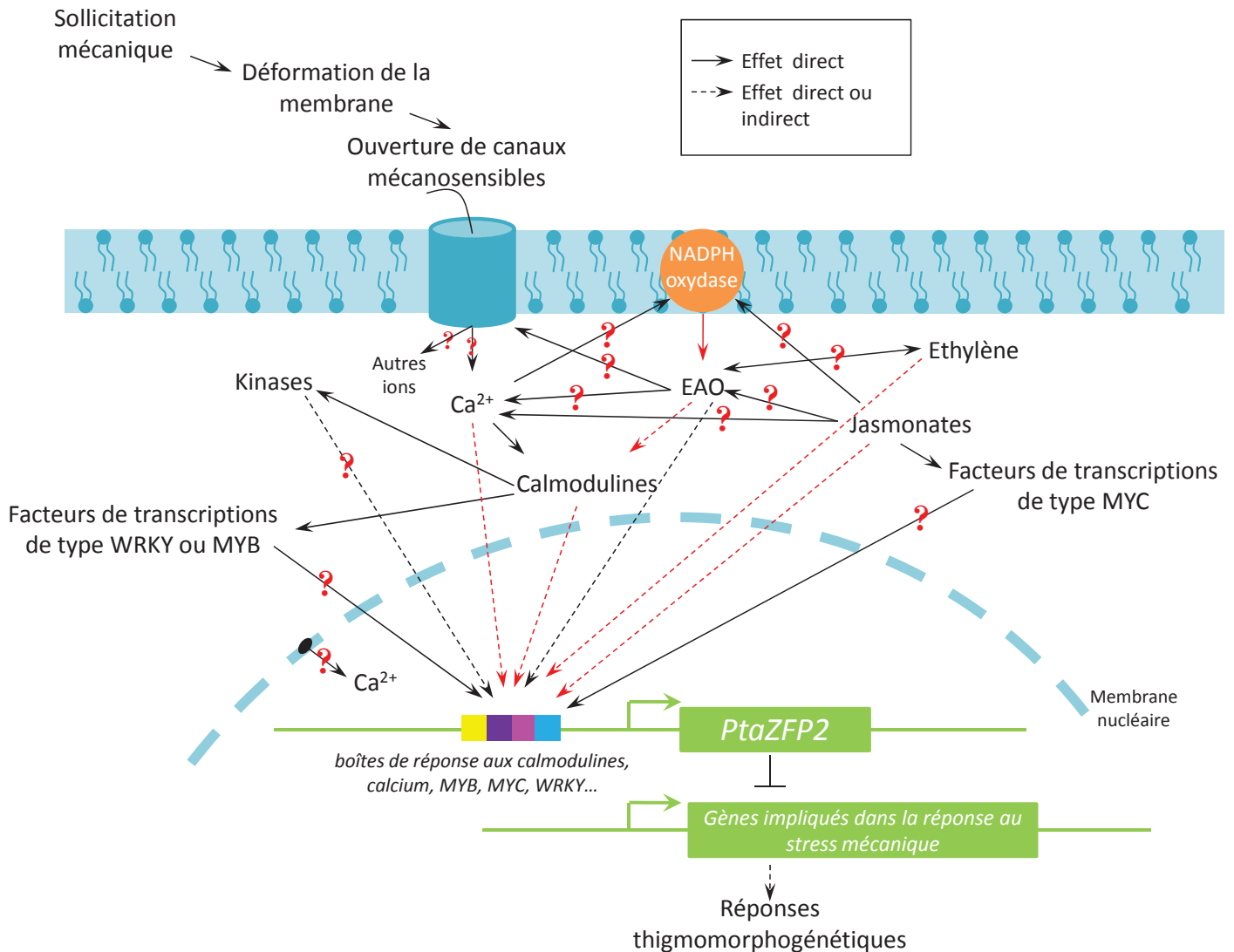
Le protocole de sollicitations mécaniques mis en place sur culture cellulaire rend difficile la mesure de la déformation subie par les cellules et ne nous a donc pas permis de valider le modèle  $S^3m$  au niveau cellulaire, modèle qui prédit que le signal mécanoperçu par les cellules est la déformation de la membrane. Il faut donc maintenant rechercher un dispositif expérimental permettant à la fois de mesurer la déformation subie par la membrane plasmique et d'analyser l'expression du gène *PtaZFP2*. Toutefois, une analyse d'images des cellules en mouvement permettrait de calculer la force d'accélération subie par les cellules et donc de relier de manière quantitative l'intensité de la réponse à l'intensité de la sollicitation. On pourrait également tester l'effet de sollicitations répétées en faisant varier la vitesse d'agitation de 125 à 320 rpm avec des temps de sollicitation espacés de temps de « repos » variables (effet des fréquences).

Puisque ce protocole d'agitation permet d'étudier facilement la régulation du gène en réponse à une sollicitation mécanique, il pourrait être utilisé pour préciser les cinétiques moléculaires mises en jeu au cours de l'accommodation.

## *2. La régulation du gène PtaZFP2*

### **a. Les messagers secondaires et les signaux chimiques impliqués dans la régulation rapide de l'expression du gène PtaZFP2 au cours d'une sollicitation mécanique**

La mise au point du protocole de sollicitation mécanique sur cultures cellulaires nous a permis de suivre l'expression de *PtaZFP2* sous l'effet de plusieurs molécules choisies soit



**Figure 51 : Modèle proposé de la régulation de l'expression de *PtaZFP2* en réponse à la sollicitation mécanique.** Les relations démontrées au cours de ce travail de thèse sont indiquées en rouge. Les relations hypothétiques provenant de la littérature sont indiquées en noires. Les interactions décrites autour du calcium dans le cytosol sur la figure pourraient éventuellement avoir lieu dans le noyau en fonction de l'origine du calcium.

parmi des molécules déjà identifiées dans la littérature comme impliquées dans la réponse au stress mécanique, soit en lien avec l'étude des éléments *cis* régulateurs présents sur le promoteur de *PtaZFP2*. Grâce à des traitements extracellulaires, nous avons ainsi montré que le calcium, l' $H_2O_2$ , le méthyljasmonate et l'éthéphon sont capables d'induire rapidement l'expression de *PtaZFP2* ainsi que de l'expression *PtaZFP1*, un autre gène codant une Q-type C2H2-ZFPs, phylogénétiquement proche de *PtaZFP2* et répondant également à la sollicitation mécanique *in vivo* lors de flexion de plants de peupliers fléchis. Toutefois, comme beaucoup de gènes codant des C2H2-ZFPs chez d'autres espèces, ces deux gènes ne sont pas régulés spécifiquement par un stress mécanique mais semblent au contraire être impliqués dans la réponse au froid, au choc osmotique ou au stress salin. Pour tester si ces molécules régulatrices sont réellement impliquées dans la voie de signalisation du stress mécanique, nous avons utilisé une approche pharmacologique en étudiant l'effet de différents inhibiteurs sur des cellules soumises à une sollicitation mécanique : le  $LaCl_3$  et le  $GdCl_3$  inhibiteurs de différents canaux calciques de la membrane plasmique, le W7 antagoniste des calmodulines, le DPI et le DIECA respectivement inhibiteurs des voies des EAO et des jasmonates. L'induction de *PtaZFP2* par la sollicitation mécanique est inhibée par le traitement des cultures cellulaires avec ces inhibiteurs. Ces molécules semblent donc être impliquées dans la régulation de l'expression de *PtaZFP2* en réponse au stress mécanique. Sur la Figure 51, nous proposons un schéma bilan de la régulation du gène *PtaZFP2* en réponse à la sollicitation mécanique tenant compte de l'ensemble de ces molécules effectrices.

Le calcium est connu pour être un messager secondaire important, impliqué dans de nombreux processus cellulaires ainsi que dans la réponse à de nombreux stress. Il est également établi qu'un signal donné va induire une signature calcique particulière (amplitude, fréquence, durée), induisant la spécificité de la réponse (McAinsh and Hetherington, 1998; McAinsh and Pittman, 2009). En ce qui concerne le rôle du calcium, plusieurs études antérieures ont observé un pic de la concentration en calcium cytosolique 1 à 2 minutes après l'application d'un stress mécanique (Knight *et al.*, 1991; Knight *et al.*, 1992). De plus, plusieurs gènes codant pour des calmodulines ou protéines calmoduline-like sont régulées de manière rapide (10 minutes) et transitoire suite à une sollicitation mécanique (Braam and Davis, 1990; Lee *et al.*, 2005). Les résultats obtenus avec le W7



suggèrent que des calmodulines se situent en amont de la régulation de *PtaZFP2* dans la voie de signalisation du signal mécanique (Figure 51). L'origine du calcium impliqué dans la voie de signalisation reste encore à déterminer. En effet, dans nos travaux, l'utilisation d'inhibiteurs des canaux calciques de la membrane plasmique ( $\text{LaCl}_3$  et  $\text{GdCl}_3$ ) n'a pas permis d'inhiber l'induction de *PtaZFP2* en réponse au stress mécanique. Au contraire, on observe une induction de l'expression du gène par le  $\text{GdCl}_3$  en absence de sollicitation. En réalité, plusieurs études ont montré que, face à des modifications de la voie calcique, la cellule tend à maintenir rapidement une certaine homéostasie de la concentration en calcium (Polisensky and Braam, 1996). Ainsi, si on bloque les mouvements entrants de calcium extracellulaire, un pic de calcium cytosolique est observé provenant des pools de calcium des organites (la vacuole et le réticulum), ce qui a pour effet le maintien de l'homéostasie. Lors d'une étude sur cultures cellulaires portant sur la régulation des gènes *TCH* d'*Arabidopsis thaliana*, l'utilisation de  $\text{LaCl}_3$  et  $\text{GdCl}_3$  avait mené à des résultats similaires aux nôtres (pas d'inhibition de la réponse au stress et induction de l'expression des gènes en absence de stress) (Polisensky and Braam, 1996). L'ensemble de ces résultats pourraient suggérer que l'augmentation du calcium intracellulaire ne serait pas d'origine extracellulaire *via* l'ouverture de canaux calciques membranaires. Toutefois, lors d'une approche pharmacologique, des doutes subsistent quant aux cibles réelles des inhibiteurs utilisés. De plus, tous les canaux calciques membranaires n'ont pas été inhibés dans nos expériences. Bien que les organites cellulaires étaient, jusqu'à récemment, considérés uniquement comme des « sources » de calcium pour le cytosol et ses voies de signalisation, il est maintenant clairement démontré que des signatures calciques indépendantes du calcium cytosolique ont lieu dans les chloroplastes, les mitochondries et le noyau (van der Luit *et al.*, 1999; Mazars *et al.*, 2009; Mazars *et al.*, 2010). Pour le noyau, il était admis que l'augmentation du calcium dans ce compartiment cellulaire était liée à une entrée de calcium cytosolique passant librement à travers les pores nucléaires. Des études récentes suggèrent que le calcium se trouvant dans l'enveloppe nucléaire et dans le réticulum endoplasmique associé à celle-ci pourrait être mobilisé spécifiquement pour déclencher un signal calcique dans le noyau, indépendamment du calcium cytosolique. Ainsi le noyau serait capable de générer sa propre signature calcique et de réguler ainsi certains processus

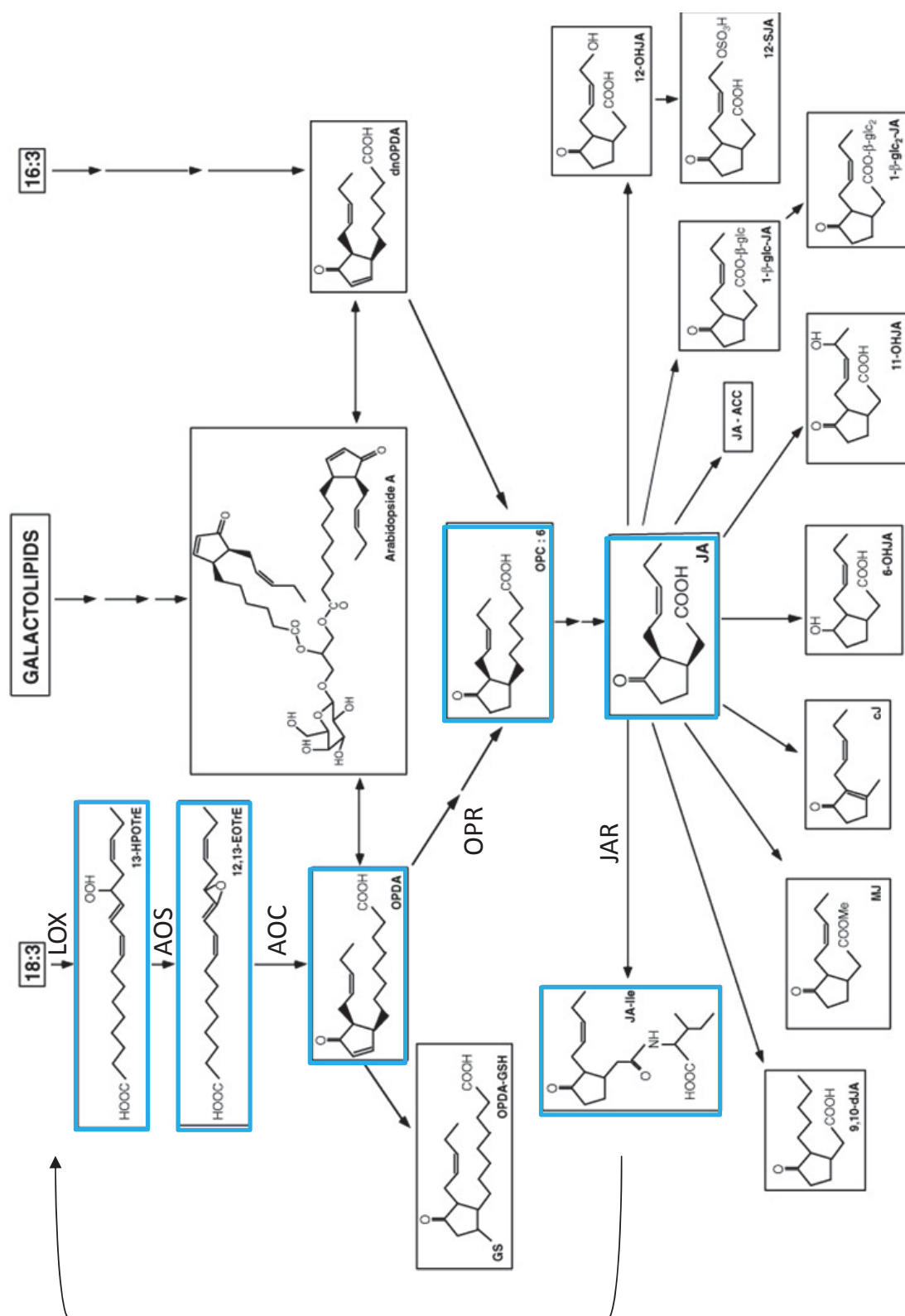




nucléaires. La signature calcique nucléaire serait décodée par des senseurs de calcium tels que des calmodulines ou des kinases calmoduline-dépendantes (Kim *et al.*, 2009).

De manière intéressante, des signatures calciques nucléaires ont été observées en réponse au vent sur des plants de tabac transformés par une aequorine dirigée spécifiquement dans le noyau et cette augmentation de calcium nucléaire régulerait l'expression d'un gène codant pour une calmoduline (van der Luit *et al.*, 1999). Or, le BAPTA-AM, un chélateur de calcium perméable aux membranes, inhibe en partie ce signal calcique nucléaire et l'expression du gène alors que le rouge de ruthénium, inhibiteur des canaux calciques des membranes internes, n'a aucun effet sur cette réponse. Ainsi, l'induction de l'expression de *PtaZFP2* (qui est potentiellement un facteur de transcription) suite à la sollicitation mécanique pourrait être due à des variations de calcium nucléaire et serait indépendante du calcium cytoplasmique. Afin de préciser l'implication du calcium et son origine, l'approche pharmacologique que nous avons menée pourrait être complétée par l'utilisation soit des inhibiteurs des canaux calciques des membranes internes (rouge de ruthénium) ou des canaux calciques voltages dépendants (comme le vérapamil) en combinaison avec le  $\text{LaCl}_3$  ou le  $\text{GdCl}_3$ , soit des chélatants non perméables (EDTA, EGTA) ou perméables (BAPTA-AM), soit des ionophores (A23187 ou ionomycine) du calcium. Finalement, afin de vérifier précisément l'origine du calcium impliqué dans la réponse à la sollicitation mécanique, il pourrait également être envisagé d'utiliser des plants transgéniques exprimant l'aequorine de façon cytoplasmique ou nucléaire (fusion avec la nucléoplasmine par exemple (van der Luit *et al.*, 1999)).

Les espèces activées de l'oxygène constituent d'autres messagers secondaires communs à plusieurs voies de signalisation. Dans notre étude, nous avons montré que l'expression de *PtaZFP2* est régulée par un apport extracellulaire d' $\text{H}_2\text{O}_2$  sur des cultures cellulaires de peuplier. Chez les plantes, quatre sources potentielles peuvent être à l'origine de la production d'EAO en réponse aux stress biotiques et abiotiques : l'activité de la NADPH oxydase au niveau de la membrane plasmique, celle des peroxydases au niveau de la paroi cellulaire, celle des amines oxydases au niveau de l'apoplasme (continuum formé par les parois cellulaires et les espaces entre les cellules) et celle de la xanthine oxydase qui est



LOX = lipoxygénase    AOS = allène oxyde synthase    AOC = allène oxyde cyclase    JAR = jasmonic acid resistant    OPR = oxo-phytyldienoate reductase

Figure 52 : Voie de biosynthèse des jasmonates.

principalement cytoplasmique (Pourrut *et al.*, 2008). Le DPI est connu pour être un inhibiteur de la NADPH oxydase et nos travaux montrent qu'un prétraitement des cellules en présence de cet inhibiteur empêche l'induction de l'expression de *PtaZFP2* par une sollicitation mécanique. Ces résultats suggèrent que le signal mécanique induit une production d'EAO qui serait NADPH oxydase-dépendante et qui serait en amont de l'expression de *PtaZFP2*. Toutefois il a également été montré que le DPI pouvait inhiber la peroxydase (Frahry and Schopfer, 1998). A court terme, d'autres inhibiteurs de cette voie des EAO devront être testés sur les cultures cellulaires de peuplier, comme le DMTU qui piège l' $H_2O_2$  (« *H\_2O\_2-scavenger* ») ou le  $NaN_3$  (azide de sodium) qui est un inhibiteur de la peroxydase afin de préciser ces résultats.

D'autre part, nos travaux suggèrent que les EAO semblent agir en amont des calmodulines dans la cascade de réponse au signal mécanique. En effet, un antagoniste des calmoduline (W7) inhibe l'effet du  $H_2O_2$  sur l'induction de l'expression de *PtaZFP2*. La production d' $H_2O_2$  *via* la NADPH oxydase déclencherait un pic de calcium qui activerait des calmodulines ou d'autres protéines senseurs du calcium, ce qui se traduirait par la régulation de l'expression de *PtaZFP2* (Figure 51). Plusieurs études récentes ont révélé des interactions entre la voie calcique et la production d'EAO (pour revue voir (Mazars *et al.*, 2010)). Chez la fève (*Vicia faba*), la production d'EAO induite par le plomb nécessite une étape calmoduline-dépendante et est associée à l'activation de la NADPH oxydase (Pourrut *et al.*, 2008). Dans les racines de tournesol, le calcium est impliqué dans l'activité NADPH oxydase : le  $LaCl_3$ , le vérapamil ou l'EGTA inhibent la production d' $O_2^{\cdot -}$  et l'activité d'une peroxydase (Garrido *et al.*, 2009). Dans ces deux cas, le calcium et les calmodulines seraient en amont de la production d'EAO. Au contraire, dans les feuilles de maïs, l'ABA et l' $H_2O_2$  induisent une augmentation de calcium cytosolique ainsi que l'expression du gène *CaM1*. D'autre part, un traitement par le W7 inhibe la surproduction des enzymes de la voie antioxydante et la production d' $H_2O_2$  induite par l'ABA, mais l'utilisation de DMTU ou de DPI n'inhibe pas l'expression de *CaM1*. Ces résultats suggèrent que le calcium et les calmodulines sont impliquées à la fois en amont et en aval du  $H_2O_2$  dans la défense antioxydante induite par l'ABA (Hu *et al.*, 2007). L'ensemble de ces résultats montrent d'une part que la production d' $H_2O_2$  peut être calcium-dépendante mais aussi que les EAO peuvent réguler la concentration de calcium cytosolique *via* l'activation de canaux calciques membranaires



(Mazars *et al.*, 2010). De plus, et dans l'hypothèse où le calcium impliqué dans la réponse à la sollicitation mécanique serait d'origine nucléaire, il a été mis en évidence des interconnexions entre les voies des EAO et du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le noyau, dans le cas de symbioses ou de réponses aux pathogènes (Mazars *et al.*, 2010).

Concernant les jasmonates, il a déjà été montré une augmentation de leur taux suite à une sollicitation mécanique chez *Medicago truncatula* (Tretner *et al.*, 2008), ainsi qu'une accumulation des transcrits du gène *LOX* en réponse au toucher ou au vent chez *Arabidopsis thaliana* et le blé respectivement (Mauch *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2005). L'effet de la flexion sur l'expression de gènes de la voie de biosynthèse des jasmonates a été étudié au laboratoire chez le peuplier. Il a ainsi été montré une induction rapide de l'expression des gènes *LOX3*, *AOC*, *OPR* et *JAR4* en réponse à la flexion de la tige mais avec des cinétiques différentes (Lakhal, 2010). En effet, bien que le gène *LOX* code pour la première enzyme de la voie de biosynthèse des jasmonates (Figure 52), il semblerait que le gène *AOC* soit induit en premier par la flexion. Ces résultats suggèrent que la flexion déclenche une production d'OPDA en premier lieu, menant à la synthèse du jasmonate et de ses dérivés. Ceux-ci exerceraient un rétrocontrôle positif sur l'expression de *LOX*. Un tel rétrocontrôle du méthyljasmonate sur *LOX* a déjà été montré chez le tabac (Veronesi *et al.*, 1999). Dans ce travail de thèse, nous démontrons que le méthyljasmonate régule l'expression de *PtaZFP2* et qu'un inhibiteur de la synthèse du jasmonate (DIECA) inhibe l'induction de ce gène en réponse à une sollicitation mécanique. De façon intéressante, il a été montré chez *Arabidopsis thaliana* que ZAT10 et AZF2 (deux facteurs de transcription répresseurs de type C2H2-ZFPs) sont capables de se fixer sur le promoteur de *LOX3* et de réprimer son expression (Pauwels and Goossens, 2008). Si le produit de *PtaZFP2* était capable lui aussi de réguler l'expression de *LOX3*, on aurait alors un rétrocontrôle négatif de *PtaZFP2* sur la voie de biosynthèse des jasmonates. Ceci pourrait expliquer l'expression transitoire des gènes de la voie des jasmonates suite à une sollicitation mécanique. Finalement, il a récemment été montré que l'OPDA et le jasmonate sont capables d'induire très rapidement un signal calcique à la fois dans le noyau et dans le cytosol dans des cellules de tabac avec des cinétiques différentes en fonction des composés (Walter *et al.*, 2007), montrant la complexité des interconnexions entre les différents acteurs régulant l'expression de



*PtaZFP2*. Dans la même étude, les auteurs montrent qu'en revanche le méthyljasmonate n'induit pas de signal calcique : l'induction de *PtaZFP2* en réponse au méthyljasmonate (chapitre 1) ne serait pas due à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique ou nucléaire. Dans l'étude de Garrido et ses collaborateurs (2009) sur les racines de tournesol, le méthyljasmonate augmente l'activité de la NADPH oxydase. Ainsi cette enzyme clé de la voie de production des EAO pourrait jouer un rôle central en réponse au stress mécanique. Il a également été montré que le méthyljasmonate est capable d'induire une production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Orozco-Cardenas and Ryan, 1999) et il serait donc intéressant d'étudier les connections jasmonates-EAO dans la régulation de l'expression de *PtaZFP2*, en testant les inhibiteurs des EAO (DPI, DMTU) sur l'induction de *PtaZFP2* par les jasmonates.

Enfin, l'éthylène pourrait être impliqué dans des voies de réponse au stress mécanique (Brown and Leopold, 1973; Robitaille and Leopold, 1974; Biro and Jaffe, 1984; Jaffe and Forbes, 1993). Dans le chapitre 1, nous montrons que l'éthéphon, qui se décompose en éthylène en solution et est donc généralement utilisé pour tester son effet, est capable d'induire l'expression de *PtaZFP2*. L'éthylène semble donc jouer un rôle dans la régulation de l'expression de *PtaZFP2*. Cependant, il a aussi été montré récemment que l'éthéphon, utilisé ici sur les cultures cellulaires, ne mime pas complètement les effets de l'éthylène (Zhang and Wen, 2010) et que sa décomposition relarguerait à la fois de l'éthylène et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Alonso and Ecker, 2001). L'induction de *PtaZFP2* par l'éthéphon pourrait donc n'être qu'un artefact et l'expression de *PtaZFP2* ne pas être induite par l'éthylène. Afin de confirmer l'effet observé de l'éthylène sur *PtaZFP2*, il pourrait donc être utile de tester l'effet de l'éthylène gazeux directement sur des plants de peuplier. De plus, afin de tester son implication dans la réponse au stress mécanique de *PtaZFP2* (de la même façon qu'avec les jasmonates, les calmodulines ou l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), il serait intéressant de tester l'effet d'inhibiteurs de la voie éthylénique sur la réponse du gène *PtaZFP2* à la sollicitation mécanique. Parmi ces inhibiteurs, on peut citer l'AOA (acide amino-oxyacétique) et l'AVG (aminoéthoxyvinylglycine) qui sont des inhibiteurs de l'ACC synthase, première enzyme de la voie de biosynthèse de l'éthylène, et le 1-MCP (1-méthylcyclopropène) qui se fixe spécifiquement sur les récepteurs de l'éthylène et bloque donc sa voie de réponse (Canuto *et al.*, 2010; Lavee *et al.*, 2010). Finalement, puisque que l'éthylène et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peuvent



PtZFP2 TAAATATTCCTTATG-----TCATTTTCAATTAATATTATTTTAATAGGGGTTTC 50  
PtaZFP2 TAAATATTCCTTATGCAACGTCAAGTCAATTTCCAATTAACATTTATTAATAGGGGTTTC 59  
PtZFP1 -----

PtZFP2 TACATGAACAAATCTAAGTTGGGTATCATGCACGCG-CTTCTAAGTGC GGTTGGACTTGC 109  
PtaZFP2 TACATGAACAAATCTAAGTTGGGTATCATGCACGCG-CTTCTAAGTGC GGTCGGACTTGC 118  
PtZFP1 -----AACATATTTAAAGGTGGCTGCCGTGCACGCGTCTTCTAAGTGC GGTTGGGGCTTGT 54  
\*\*\*\* \* \* \* \* \*

PtZFP2 ACTCAACATAAAATATAAGGAATTGTCAACACATG-ATATTATGTACTTTAGGAAGGAAG 168  
PtaZFP2 ACTCAATATAAAATATAAGGAATTGTCAACACGCTG-ATATGATG-ACCTTAGGAAGGAAG 176  
PtZFP1 TCTGAA--AGATTCTA--GACTAGTCAACATAAGGAGATGATT-CCTTTAGGAAGGAAG 108  
\* \* \* \* \*

PtZFP2 GGTCGTAGT---GGCTCACCATCAATGACCGATGTGATCCCGCTCCCCAAGTTTGCTCA 225  
PtaZFP2 AATCGTAGTAGTGGCTCACCATCAATGACCGGATGTAATCCTGCTCACCAAGTTTGCTCA 236  
PtZFP1 ACTCCTAGT---GGCTCACCATCAAGGACCGACCTGAACCC-CTCCTCAAGTATGCTAA 164  
\* \* \* \* \*

PtZFP2 ACGCGGTCACGCGAACGCATCA-TTACTATTGCTAAACTCTCACCTTCTATTCTACTCTT 284  
PtaZFP2 ACGCGGTCACGCTAACGCATCA-TTACC AACGCTAAACTCTCACCTTCTATTCTACTCTT 295  
PtZFP1 ACGCGG-CACGTTGACGTATCAATCACGGCAGCTGCACTCTCACCATCTATTTCACTCTA 223  
\*\*\*\*\* \* \* \* \* \*

PtZFP2 ATTACATGTCTACCACACGCTCTAAATTTCTCTAGCCTCAAGTGTGAGGGGCATAATTG 344  
PtaZFP2 ATTACATGTCTACCACACGCTCTAAAGCTCTCTAGCCCAAGTGTGAGGGGCATAATTG 355  
PtZFP1 ATTACTAGTCTACCAC-----TATTTAG-----GGGCATAACCG 257  
\*\*\*\*\* \* \* \* \* \*

PtZFP2 CCCCTCAAGCAAGACGTGAGTGTCTACTCGGAGTAC---CAGCTTCGTCCAACCTTAT 401  
PtaZFP2 CCCCTCAAGCAAGACGTGAGTGTCTACTCGGAGTAC---CAGCTTCGTCCAACCTTAT 412  
PtZFP1 CCATTC AATCCAGACGTGAGTGTCTACTCGGTTGTGCTGCCAACTCGGACCAGCCTCGT 317  
\* \* \* \* \*

PtZFP2 ATAAATACGAACCTCAT--AGTC--CCTTAATTCCAT-CCAACCATCAAATATTCAGCCAC 456  
PtaZFP2 AAATATAAGAACTCAC--AGTC--CCTAACTTCCAT-CCAACCATCAAATATTC AACCAC 467  
PtZFP1 ATAAATACAACCGATCTGGTCTCCCTTACTTCCATTCATCCATCAAATATTC----- 371  
\* \* \* \* \*

PtZFP2 CTTCTTCTTTTGAAGCTTTATACCTTTGTTGTTCTTGCTCATCGTATAAACACAAATCATA 516  
PtaZFP2 CTTCTTCTTTTGAAGCTTTATACCTTTGTTGTTCTTGCTCATCGTATAAACACAAATCATA 527  
ZFP1 -----

PtZFP2 CTATATATCTAATCTATAGATTTAATTACC 546  
PtaZFP2 CTATATATCTAACCTGTAAGCTTAATTACC 557  
PtZFP1 -----

**Figure 53 : Alignement des portions de séquences homologues des promoteurs de *PtaZFP2*, *PtZFP2* et *PtZFP1* et recherche des éléments *cis* régulateurs.**

- Site de fixation des calmodulines : **CGCG-box**
- Éléments *cis* régulateurs présents sur le promoteur ZAT12 (Doherty *et al.*, 2009): **CM1 CM3 CM5 CM6**
- Fixation de facteurs de transcriptions : **ABRE(bZIP) MYB MYC**
- Régulation par les jasmonates : **MeJa**
- Expression dans le méristème : **CAT-box**
- Implication dans la blessure, le stress mécanique... : **S-box WUN-box w-box**(interaction avec facteurs de transcription WRKY, Martin *et al.*, 2009) **RSRE**(Walley *et al.* 2007)
- **Regions** essentielles pour la fixation des deux doigts de zinc chez ZPT2 -2 de pétunia : ici séparés de 15 pb, il doivent être séparés de 11 pb pour ZPT2-2(Yoshioka *et al.*, 2001)
- **A(C/G)T** (séparés de quelques pb) essentiels pour la fixation de AZF2 et STZ chez *Arabidopsis thaliana* (Sakamoto, 2004)
- **TATA-box**

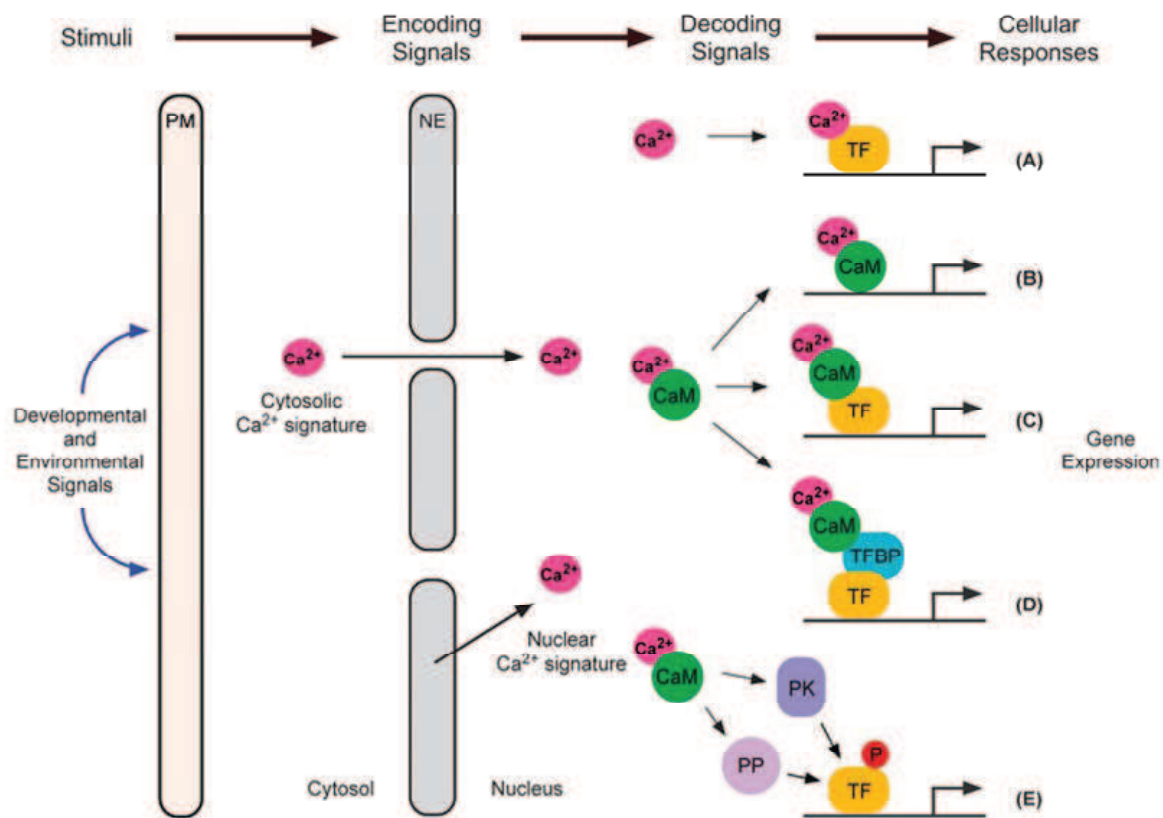
mutuellement réguler leurs voies de signalisation (Wang *et al.*, 2002; Gechev *et al.*, 2006; Steffens and Sauter, 2009), on pourrait tester l'effet croisé des inhibiteurs de ces voies sur l'expression de *PtaZFP2*.

La Figure 51 fait un bilan de toutes ces interactions. Sur ce schéma, *PtaZFP2* est montré comme réprimant des gènes impliqués dans la réponse au stress mécanique : on retrouve en effet le motif EAR jouant un rôle dans l'activité de répresseur des C2H2-ZFPs (Ohta *et al.*, 2001; Kazan, 2006; Ciftci-Yilmaz *et al.*, 2007; Kagale *et al.*, 2010). Toutefois, les gènes régulés par *PtaZFP2* restent à identifier...

Finalement, afin de mieux définir et comprendre cette voie de signalisation au signal mécanique faisant intervenir *PtaZFP2*, d'autres traitements pourraient être utilisés. Tout comme nous avons combiné les traitements W7 et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, on pourrait combiner les différents traitements et inhibiteurs afin d'établir une hiérarchie entre les acteurs moléculaires identifiés dans la cascade de réponse. Il pourrait être également intéressant de mesurer directement le taux et la cinétique d'accumulation de certaines de ces molécules (exemple : produits de la voie de biosynthèse des jasmonates).

**b. Le promoteur de *PtaZFP2* et les facteurs de transcription potentiellement impliqués dans sa régulation**

L'analyse du promoteur de *PtaZFP2* à l'aide des délétions successives avait pour but de définir des zones importantes de ce promoteur sur lesquelles pourraient se lier physiquement des facteurs de transcription impliqués dans sa régulation suite à une sollicitation mécanique. Au cours de ce travail, seule la construction comportant les 210 premières paires de base en amont de l'ATG de la séquence codante de *PtaZFP2* a pu être analysée. Au cours de cette analyse, nous avons pu constater que les 200 premières paires de bases du promoteur ne suffisent pas à induire l'expression du gène par la sollicitation mécanique ou par les différents traitements (calcium, éthéphon, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Toutefois une seule lignée de cellules transformées a été testée et la comparaison de ces résultats avec ceux des autres constructions est nécessaire pour conclure sur ces données.



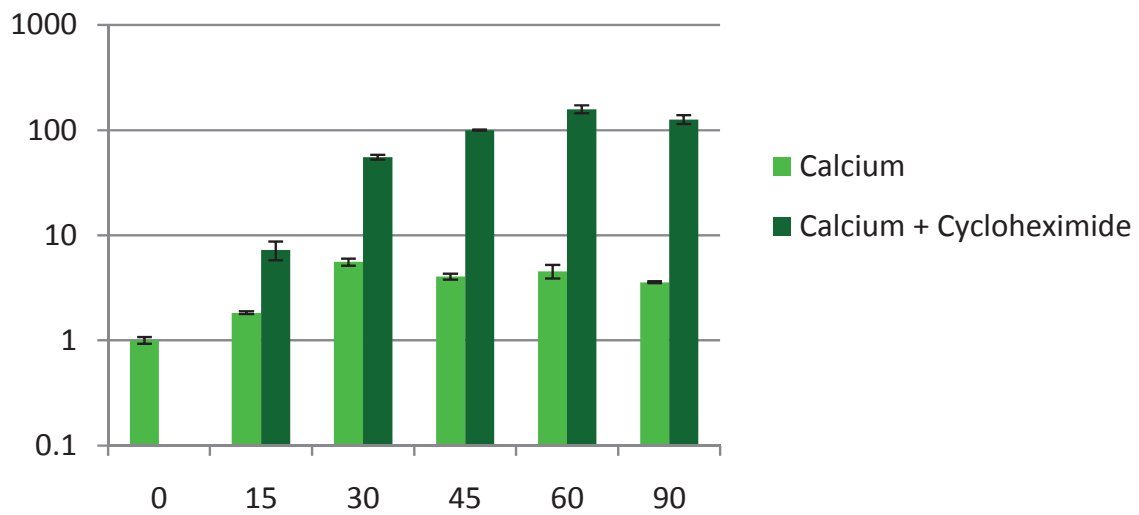
**Figure 54 : Mécanismes de la régulation transcriptionnelle faisant intervenir le calcium et les calmodulines chez les plantes.** Dans le cas le plus simple, le  $\text{Ca}^{2+}$  se fixe directement au facteur de transcription et régule son activité (A). Le calcium peut se fixer à une calmoduline (CaM) et le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM se fixe à l'ADN pour fonctionner comme un facteur de transcription (B). Plus communément, le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM se fixe à un facteur de transcription (FT) et régule son activité (C). Le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM peut réguler indirectement la transcription en participant à une machinerie transcriptionnelle composées du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, d'un facteur de transcription et d'une protéine se fixant au facteur de transcription (transcription factor-binding protein, TFBP) : cette dernière fonctionne comme un « pont » entre le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM et le facteur de transcription (D). Finalement, le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM régule l'expression de gènes *via* la régulation de l'état de phosphorylation des facteurs de transcription : on a alors intervention de protéine kinase ou de phosphatase se fixant aux CaM (E).

PM : plasma membrane, NE : nuclear envelop, CaM : calmodulin, TF : transcription factor, TFBP : transcription factor-binding protein, PK : protein kinase, PP : protein phosphatase, P : phosphate.

D'après Kim et al., 2009

Ayant montré que le gène *PtaZFP1*, un autre gène de la famille des Q-type C2H2 du peuplier, était également induit par une flexion de la tige chez le peuplier, nous avons recherché dans la base de données du génome du peuplier les 1000 pb en amont de l'ATG des homologues de *PtaZFP1* et *PtaZFP2* chez *Populus trichocarpa* (*PtZFP2* et *PtZFP1* respectivement). Une comparaison des promoteurs de *PtZFP2* et *PtZFP1* avec le promoteur de *PtaZFP2*, montre des homologies de 91% entre *PtaZFP2* et *PtZFP2* sur les 545 premières paires de bases en amont de l'ATG, 71% sur 371 pb entre *PtZFP2* et *PtZFP1* et 70% sur la même région entre *PtZFP1* et *PtaZFP2*. Ces analyses *in silico* suggèrent que les boîtes de réponse impliquées dans la réponse à la sollicitation mécanique sont potentiellement localisées dans ces régions communes. L'alignement des portions de séquences homologues entre les trois promoteurs et la recherche d'éléments *cis* connus et intéressants (retrouvés dans la littérature ou grâce au logiciel Plant Care) sont présentés dans la Figure 53.

Nous pouvons constater que, certains éléments *cis* régulateurs sont présents sur les trois promoteurs. C'est le cas de la boîte de réponse CGCG trouvée à deux endroits sur les trois promoteurs et décrite comme étant un site de fixation potentiel pour les calmodulines (Yang and Poovaiah, 2002). Nous avons montré précédemment que les calmodulines intervenaient probablement en amont de l'expression de *PtaZFP2* dans la voie de signalisation au stress mécanique. Comme le montre la Figure 54, le calcium et les calmodulines peuvent réguler, directement l'expression de certains gènes en se fixant directement sur le promoteur de ces gènes (Kim *et al.*, 2009). Ces boîtes de réponse pourraient donc être particulièrement importantes pour la régulation de *PtaZFP2* au cours de la sollicitation mécanique. D'autre part, il a également été montré que les calmodulines peuvent agir indirectement sur l'expression des gènes en interagissant et en activant certains facteurs de transcription comme les facteurs de transcription de type MYB ou WRKY (Yoo *et al.*, 2005; Rushton *et al.*, 2010). Or, il est intéressant de noter que des boîtes de réponses à ces facteurs sont retrouvées sur le promoteur de *PtaZFP2* et celui de *PtZFP2*. Les calmodulines peuvent également réguler l'expression de certains gènes en activant la phosphorylation de certains facteurs de transcription (Snedden and Fromm, 1998; Zielinski, 1998; Zhang and Lu, 2003). L'importance des phosphorylations/déphosphorylations dans la régulation de *PtaZFP2* devra donc également être testée.



**Figure 55 : Cinétique d'accumulation des ARNm de *PtaZFP2* en réponse à un traitement calcium et cycloheximide.** Les cellules ont été soumises à un traitement calcium (10 mM) + cycloheximide (50  $\mu$ M) ou non. Les ARNs totaux ont été extraits à différents temps (0, 15, 30, 45, 60 et 90 minutes de traitement). L'accumulation relative de transcrits (Qr) a été déterminée par PCR quantitative en temps réel et correspond à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes  $\pm$  SE.

On trouve également dans les trois promoteurs des boîtes de réponse au méthyljasmonate ainsi que des boîtes de réponses aux facteurs de transcription MYC. Or, il a été montré que les jasmonates pouvaient induire l'expression d'*AtMYC2* (Memelink, 2009) : le contrôle des jasmonates sur l'expression de *PtaZFP2* pourrait se faire *via* des facteurs de transcription de type MYC. La régulation de ces facteurs de transcription ainsi que leur possible régulation de *PtaZFP2* a été insérée à la Figure 51.

Des éléments *cis* de type CM sont aussi retrouvés sur ces promoteurs. Ces boîtes de réponse de type CM ont été identifiées sur le promoteur du gène *CBF2* d'*Arabidopsis thaliana*, impliqué dans la réponse au froid, puis ont été retrouvées sur le promoteur de *ZAT12*, une C2H2-ZFP également impliquée dans la réponse au froid, ainsi que sur les promoteurs de quasiment la moitié des gènes régulés par le froid (13/30). Parmi ces éléments, CM2 serait impliqué dans la réponse au stress mécanique et serait un site de fixation pour les facteurs de transcription de la famille CAMTA (calmodulin binding transcription activator). Cet élément CM2 est retrouvé deux fois (avec une substitution de base à chaque fois) dans la partie N-terminale du promoteur (-1281 pb et -1431 pb). Dans la partie C-terminale plus conservée entre les 3 promoteurs et correspondant à l'alignement (Figure 53), les boîtes CM1, CM3, CM5 et CM6 sont retrouvées avec une à deux substitutions de bases. La boîte CM5 est absente de *PtZFP1* et CM6 est spécifique de celui-ci. Ces éléments pourraient jouer un rôle dans la spécificité d'expression de *PtaZFP1* et *PtaZFP2*.

De la même façon, certaines boîtes de réponse identifiées sont moins bien conservées dans le promoteur de *PtZFP1*. Ceci pourrait témoigner d'une régulation différente entre ces gènes. Effectivement, l'étude de la régulation de *PtaZFP1* en complément de celle de *PtaZFP2* pourrait permettre de comprendre le rôle de ces deux gènes proches phylogénétiquement (*PtaZFP2* et *PtaZFP1*) dans la réponse au stress mécanique.

Enfin, au cours de l'étude de la régulation de l'expression du gène *PtaZFP2*, nous avons testé l'effet de la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique. Nous avons observé une forte accumulation des transcrits *PtaZFP2* en réponse au traitement. De plus nous avons testé l'effet de la cycloheximide sur l'induction du gène par le calcium (Figure 55). Ainsi, nous observons que la cycloheximide n'empêche pas l'induction de *PtaZFP2* par le traitement le

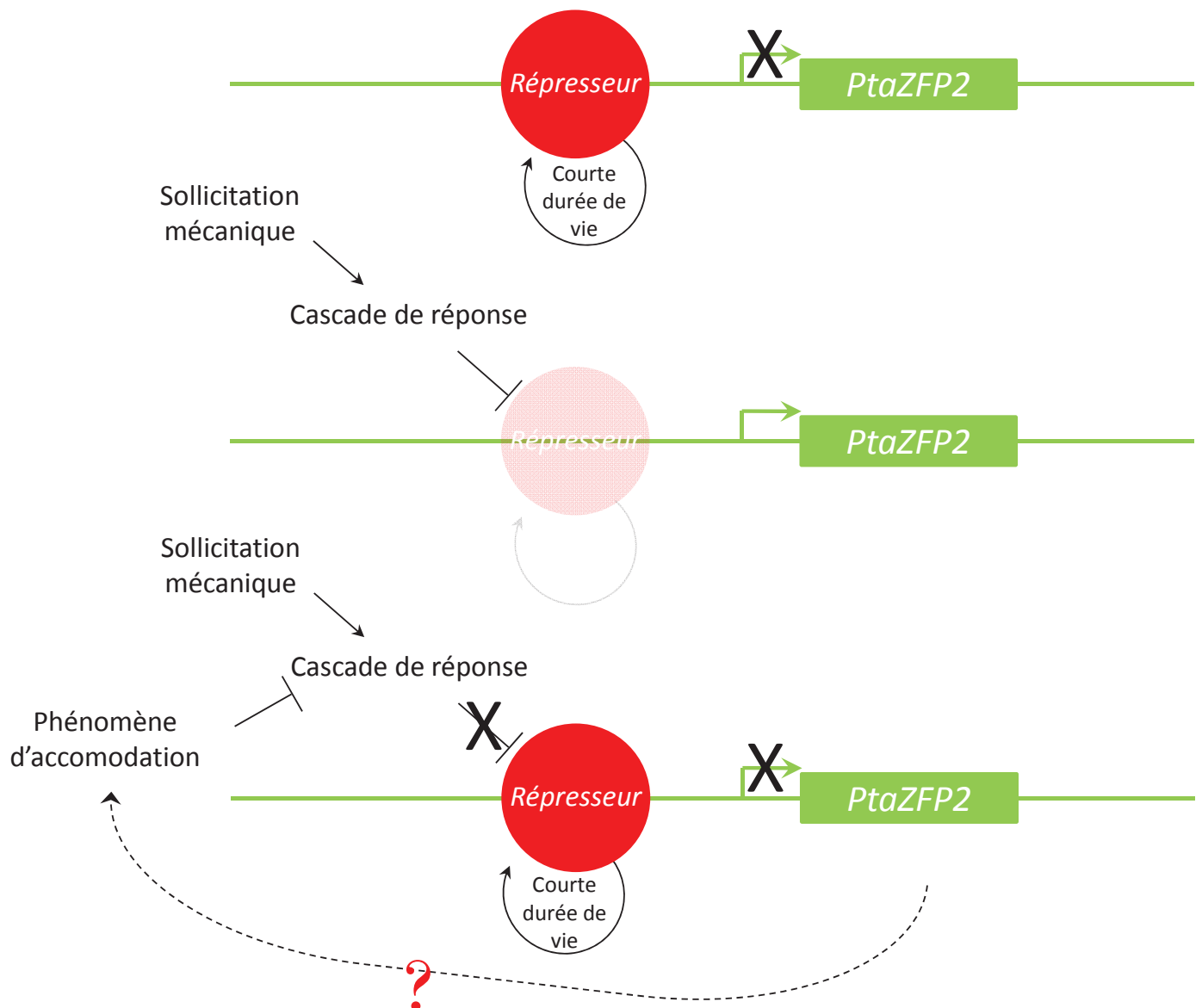


Figure 56 : Régulation de *PtaZFP2* via la présence d'un répresseur à courte durée de vie sur son promoteur.

calcium. Ce type de résultats a été observé pour la première fois chez les plantes dans le cas de la régulation des gènes par l'auxine (Koshiba *et al.*, 1995; Abel and Theologis, 1996). L'hypothèse la plus communément admise pour expliquer ces données est que la cycloheximide inhibe la synthèse *de novo* d'un répresseur à courte durée de vie, présent sur le promoteur de *PtaZFP2* : l'inhibition de sa synthèse *de novo* par le traitement conduit à la levée de la répression et à l'induction de l'expression du gène. Ceci pourrait également expliquer l'expression transitoire de *PtaZFP2* au cours de la sollicitation mécanique : l'induction de l'expression du gène serait permise par l'élimination du répresseur mais la synthèse de ce répresseur serait elle-même activée au cours des réponses mises en place par le signal mécanique et permettrait de réprimer de nouveau l'expression du gène *PtaZFP2*. Ces hypothèses sont schématisées dans la Figure 56. De plus, puisque la cycloheximide n'inhibe pas la réponse du gène au traitement calcium, cela signifie que l'induction par le calcium ne demande pas de synthèse *de novo* de protéines et donc que *PtaZFP2* pourrait être un gène de réponse primaire (Abel and Theologis, 1996; Chung *et al.*, 2008). La nature du répresseur reste à identifier. Toutefois, certains des différents facteurs de transcription potentiellement cités précédemment peuvent présenter dans certains cas une activité de type répresseur comme les facteurs de transcription de type WRKY par exemple (Rushton *et al.*, 2010). De plus les protéines de type C2H2 ont souvent démontré leur action en tant que répresseurs de la transcription et on retrouve des sites de fixations de ces protéines sur le promoteur de *PtaZFP2* (Figure 53). Ainsi, on pourrait avoir une régulation de *PtaZFP2* par d'autres protéines de type C2H2.

## *B. Que se passe-t-il en aval du gène : étude de la protéine*

### *1. Étude phylogénétique et motifs protéiques*

Chez plusieurs espèces, les différents membres de la famille des gènes codant pour les protéines de type C2H2 sont régulés de la même manière par de nombreux stress biotiques et abiotiques (Ciftci-Yilmaz and Mittler, 2008) et il est donc difficile de définir un rôle précis





pour chacun de ces gènes. Nous avons réalisé une étude phylogénétique des Q-type C2H2-ZFPs à deux doigts de zinc chez les plantes en général dans un premier temps, puis sur le peuplier en particulier. Le but était de révéler les relations phylogénétiques entre ces protéines ainsi que d'identifier des motifs protéiques conservés potentiellement indicatifs d'une fonction des protéines. Cette étude phylogénétique a permis d'identifier deux groupes phylogénétiques distincts et des « signatures » protéiques particulières à chacun de ces groupes. En particulier, au sein d'un groupe, les deux doigts de zinc de ces protéines sont différents entre eux et un groupe phylogénétique présente toujours la même association de deux doigts de zinc. Ces différences entre les deux doigts de zinc d'une même protéine C2H2-ZFP avaient déjà été montrées chez *Arabidopsis thaliana* (Englbrecht *et al.*, 2004). Puisque les doigts de zinc jouent un rôle important dans l'interaction de la protéine avec l'ADN cible (Takatsuji and Matsumoto, 1996; Kubo *et al.*, 1998; Ciftci-Yilmaz and Mittler, 2008), ces résultats suggèrent que les protéines associées à chaque groupe phylogénétique pourrait réguler un groupe de gènes différent. Alors que l'alignement des séquences a été réalisé à partir des doigts de zinc, deux nouveaux motifs protéiques spécifiques de chacun des deux groupes ont été identifiés au cours de cette étude. Le motif MALEAL est présent uniquement dans les séquences protéiques du groupe G1 alors que le motif LVDCHY se retrouve dans les séquences protéiques du groupe G2. Ces deux motifs n'ont pas encore été décrits dans les bases de données et leurs fonctions sont inconnues mais cette répartition différente entre les deux groupes phylogénétiques peut signifier des rôles différents des protéines des deux groupes.

De plus, nous avons étudié l'accumulation des transcrits de différentes isoformes de peuplier, réparties entre les deux groupes phylogénétiques, en réponse à différents types de stress (froid, blessure, stress salin, stress osmotique). Nous n'avons pas pu établir une relation claire entre les groupes phylogénétiques, les motifs protéiques et la régulation des gènes par les différents stress mais cette étude nous a toutefois permis d'identifier un autre gène *PtaZFP1*, proche phylogénétiquement de *PtaZFP2*, fortement induit par une sollicitation mécanique de type flexion. Ces deux gènes appartiennent au groupe phylogénétique G2.

L'identification de motifs protéiques conservés connus nous apporte des informations importantes sur la protéine d'intérêt *PtaZFP2*. En plus des deux doigts de zinc



caractéristiques, certains de ces motifs sont effectivement bien conservés dans la séquence protéique : (i) la L-box (EXEXXAXCLXXL) jouant un rôle dans l'interaction protéine-protéine (Sakamoto *et al.*, 2000), (ii) la DLN-box qui fait partie du domaine EAR intervenant dans l'activité en tant que répresseur de transcription (Ohta *et al.*, 2001; Kazan, 2006; Kagale *et al.*, 2010) et (iii) un motif riche en lysines (KKPK) représentant un signal d'adressage nucléaire. La présence de ces motifs caractéristiques des facteurs de transcription de type C2H2-ZFPs dans la séquence de PtaZFP2 nous donne des arguments en faveur de la fonction facteur de transcription de PtaZFP2.

## *2. Etude de la protéine*

Les difficultés que nous avons rencontrées au cours de la production des outils moléculaires (protéine recombinante, anticorps polyclonaux spécifiques) ne nous ont pas permis une étude fonctionnelle de la protéine PtaZFP2. Toutefois, les résultats préliminaires ouvrent la voie à de nombreuses perspectives.

Si la localisation nucléaire de PtaZFP2 n'a pu être clairement établie par la technique d'agroinfiltration, les immunodétections réalisées à l'aide des anticorps anti-PtaZFP2 sur des tiges de peuplier fléchies montrent qu'une partie de la protéine est nucléaire. Il reste à tester l'hypothèse selon laquelle la localisation du facteur de transcription pourrait être modifiée par le stress mécanique, comme cela a été révélé pour d'autres facteurs de transcription tels que l'APC (adenomatous polyposis coli) et Snail qui sont impliqués dans les tumeurs chez les animaux : ce sont des phosphorylations autour du NLS qui contrôlent la localisation et donc l'activité de ces protéines (Zhang *et al.*, 2000; Dominguez *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005; Mingot *et al.*, 2009). A court terme, le suivi de la protéine PtaZFP2 doit être réalisé également dans les fractions protéiques solubles extraites des tiges. En effet, certains facteurs de transcription présentent une double localisation subcellulaire. C'est le cas, par exemple, de protéines possédant un domaine LIM et qui peuvent être détectées à la fois dans le noyau comme une protéine du complexe de transcription, et dans le cytoplasme comme une protéine interagissant avec le cytosquelette et en particulier l'actine (Mundel *et al.*, 2000). Or, en plus des doigts de zinc, les protéines de type C2H2 possèdent également



des domaines d'interaction protéine-protéine pouvant suggérer une double fonction cellulaire de ce type de protéines.

La protéine 6His-PtaZFP2 produite dans *E.coli* nous a permis de valider les anticorps polyclonaux anti-PtaZFP2 produits à partir de deux peptides de synthèse. Cependant, la protéine recombinante s'accumule dans des corps d'inclusions et nous avons seulement pu la purifier en conditions dénaturantes. Afin de démontrer son activité en tant que facteur de transcription, à très court terme cette protéine pourra être en partie renaturée en présence de zinc pour régénérer la conformation des doigts de zinc et tester l'interaction de PtaZFP2 avec l'ADN par la technique de gel retard. Pour cette technique, on pourra utiliser des oligonucléotides contenant des séquences AGT répétées : en effet, d'autres protéines de type C2H2 ont déjà montré leur affinité pour ce type de séquences (Takatsuji and Matsumoto, 1996; Yoshioka *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2004).

Des anticorps anti-PtaZFP2 ont été produits, ils sont capables de reconnaître la protéine d'intérêt. Ils sont maintenant un outil important pour étudier l'accumulation de la protéine *in vivo* en condition témoin et suite à une ou plusieurs flexions. Les premiers tests ont aidé à mettre au point les conditions de détection de la protéine mais celles-ci peuvent encore être améliorées. Les premiers résultats montrent que la protéine semble s'accumuler fortement et transitoirement 2h après la flexion de la tige de peuplier. Ces résultats peuvent également aider à la mise au point des conditions de détection de la protéine au niveau tissulaire grâce à la technique d'immunolocalisation. En effet si cette approche n'a pas été concluante dans notre étude, les observations avaient été réalisées seulement 30 minutes après l'application de la sollicitation mécanique (en se basant sur la cinétique d'accumulation des transcrits) et la protéine n'était peut être pas en quantité suffisante pour permettre sa détection.

Les anticorps reconnaissent deux protéines de taille différente dans l'extrait protéique de tige fléchie, l'une des deux étant supérieure à la taille attendue, suggérant que la protéine PtaZFP2 pourrait être sujette à des modifications post-traductionnelles. Aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant ce phénomène pour les Q-type C2H2-ZFPs. Il pourrait donc être intéressant de rechercher quels types de modifications sont mises en place et si elles entraînent une activation ou une inactivation de la protéine. De manière surprenante, bien qu'en plus faible quantité, ces protéines sont également présentes dans l'échantillon de protéines issues des tiges témoin. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer



ces résultats : (i) soit la protéine est déjà présente à un niveau constitutif dans les échantillons (ii) soit les anticorps sont capables de reconnaître d'autres protéines de type C2H2 dans l'échantillon. Seul le séquençage de ces protéines immunodétectées permettra de conclure mais il faudra tester à nouveau la spécificité des anticorps à l'aide des peptides de synthèse ayant servi à l'immunisation des lapins.

Finalement, pour comprendre la fonction de PtaZFP2, il reste à identifier les cibles de cette protéine. Beaucoup de C2H2 sont étudiées et leur rôle dans le développement ou la réponse aux stress est souvent établi mais les cibles directes de ces protéines restent souvent inconnues. Les analyses phylogénétiques nous indiquent que ZAT12 et ZAT7 sont les protéines d'*Arabidopsis thaliana* les plus proches phylogénétiquement de PtaZFP2. Chez *Arabidopsis thaliana*, ces deux gènes sont impliqués dans la réponse au stress oxydatif (Davletova *et al.*, 2005; Mittler *et al.*, 2006), confirmant les résultats que nous avons obtenus sur la régulation du gène *PtaZFP2* par le peroxyde d'hydrogène et l'implication de la NADPH oxydase. Par ailleurs, ce messager secondaire est produit suite à de nombreux stress biotiques ou abiotiques et pourrait être le facteur convergent expliquant pourquoi ces gènes sont induits par l'ensemble de ces facteurs environnementaux. Des approches transcriptomiques réalisées sur des plants d'*Arabidopsis thaliana* sur-exprimant le gène *ZAT12* ont permis d'identifier de nombreux gènes sur-exprimés ou réprimés directement ou indirectement par cette protéine (Davletova *et al.*, 2005; Vogel *et al.*, 2005). Ces études ayant été réalisées sur des plants d'*Arabidopsis thaliana* à un stade de développement différent, il est difficile de comparer les résultats. Dans le cadre de la réponse au stress oxydatif (Davletova *et al.*, 2005), des gènes nucléaires ou chloroplastiques, codant pour des protéines impliquées dans la régulation du stress oxydant telles que des copper/zinc superoxide dismutases à cuivre ou à zinc et des chaperones de superoxide dismutase à cuivre sont induits dans les plantes transgéniques sur-exprimant *ZAT12*. D'autre part, un régulon comportant 24 gènes a été identifié dans le cadre de l'acclimatation au froid chez *Arabidopsis thaliana* (Vogel *et al.*, 2005). Parmi ces gènes, on trouve des facteurs de transcription codant les protéines CBF impliquées dans la réponse au froid mais aussi des facteurs de transcription de type MYB, des gènes impliqués dans la modification de la paroi tels que des pectinestérases ou encore des gènes impliqués dans les voies de transduction des signaux tels que des protéines kinases. En ce qui concerne la protéine ZAT7, une





approche de type double-hybride a démontré qu'elle interagit *via* son domaine répresseur EAR (motif DLN) avec le facteur de transcription WRKY70, lui-même régulé par l'acide jasmonique et jouant un rôle important dans la tolérance aux stress abiotiques.

Si on veut mieux comprendre la voie de signalisation du stress mécanique s'articulant autour de *PtaZFP2*, il est important de s'intéresser à ce qui se passe en aval de *PtaZFP2* : quelles sont les cibles de la protéine, quels gènes sont régulés par ce facteur de transcription potentiel ? Pour répondre à ces questions, deux possibilités s'offrent à nous. (i) La technique du CHIP peut être envisagée : on cherche à localiser les sites de fixation de la protéine sur la chromatine, grâce aux anticorps spécifiques, afin de récupérer les séquences d'ADN correspondantes. Cette technique est très utilisée pour déterminer les cibles directes des facteurs de transcription et a déjà été utilisée pour retrouver les cibles d'une protéine de type C2H2 : 140 gènes ont été identifiés comme étant des cibles directes de *MoCRZ1*, un facteur de transcription activé par la calcineurine ; ils sont différenciellement régulés, d'une façon calcium/calcineurine/*MoCRZ1* dépendante (Kim *et al.*, 2010). Cette technique a ainsi permis d'établir que ces gènes régulés par *MoCRZ1* sont principalement impliqués dans la voie de signalisation du calcium, le transport des petites molécules, l'homéostasie, la synthèse et la maintenance de la paroi cellulaire et la virulence fongique. (ii) Une autre possibilité pour étudier les cibles de *PtaZFP2* serait d'utiliser des plants transgéniques sur-exprimant le gène. Des plants de peuplier sur-exprimant le gène *PtaZFP2* sous contrôle d'un promoteur inductible sont disponibles au laboratoire. Comme beaucoup de plantes sur-exprimant une Q-type C2H2-ZFP (Kim *et al.*, 2004; Rizhsky *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2004; Mittler *et al.*, 2006; Ciftci-Yilmaz *et al.*, 2007), ces plants de peuplier transgéniques présentent un retard de croissance, suggérant un rôle important de ces protéines dans la croissance cellulaire. L'analyse par la technique des puces à ADN pourra identifier les gènes sur- ou sous-exprimés. Même si ce type d'approche ne donne aucune information sur les cibles directes de la protéine, ceci nous permet de déterminer les gènes se situant (directement ou indirectement) en aval de *PtaZFP2* dans la cascade de réponse au stress mécanique.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de préciser la voie de signalisation du stress mécanique impliquant le gène *PtaZFP2* chez le peuplier et d'identifier plusieurs acteurs



moléculaires, en particulier en amont de *PtaZFP2*. Il pourrait maintenant être intéressant de tester ces nouvelles pistes chez un autre modèle d'étude. En effet, *Arabidopsis thaliana* par exemple, présente l'avantage de disposer de nombreux mutants qui pourraient nous aider à confirmer l'implication de ces acteurs identifiés et leurs interactions.



*Références Bibliographiques*



A

- Abascal F, Zardoya R, Posada D** (2004) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**: 2104-2105
- Abel S, Theologis A** (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* **111**: 9-17
- Agarwal P, Arora R, Ray S, Singh A, Singh V, Takatsuji H, Kapoor S, Tyagi A** (2007) Genome-wide identification of C2H2 zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. *Plant Molecular Biology* **65**: 467-485
- Akers SW, Mitchell CA** (1984) Seismic stress effects on vegetative and reproductive development of 'Alaska' pea. *Canadian Journal of Botany* **62**: 2011-2015
- Alméras T, Costes E, Salles JC** (2004) Identification of biomechanical factors involved in stem shape variability between apricot tree varieties. *Annals of Botany* **93**: 455-468
- Alonso JM, Ecker JR** (2001) The ethylene pathway: a paradigm for plant hormone signaling and interaction. *Sci. STKE* **2001**: re1-
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3389-3402

B

- Badel E, Perré P** (2001) Using a digital X-ray imaging device to measure the swelling coefficients of a group of wood cells. *NDT & E International* **34**: 345-353
- Bailey TL, Elkan C** (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *In Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. AAAI Press, Menlo Park, California, pp 28-36
- Baluska F, Samaj J, Wojtaszek P, Volkmann D, Menzel D** (2003) Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. *Emerging links revisited. Plant Physiology* **133**: 482-491
- Bass RB, Strop P, Barclay M, Rees DC** (2002) Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science* **298**: 1582-1587
- Berger B, Stracke R, Yatusovich R, Weisshaar B, Flügge U-I, Gigolashvili T** (2007) A simplified method for the analysis of transcription factor-promoter interactions that allows high-throughput data generation. *The Plant Journal* **50**: 911-916
- Berkowitz SA, Wolff J** (1981) Intrinsic calcium sensitivity of tubulin polymerization. The contributions of temperature, tubulin concentration, and associated proteins. *Journal of Biological Chemistry* **256**: 11216-11223
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P** (1998) Calcium - a life and death signal. *Nature* **395**: 645-648
- Biddington NL** (1986) The effects of mechanically-induced stress in plants — a review. *Plant Growth Regulation* **4**: 103-123
- Biddington NL, Dearman AS** (1985) The effect of mechanically induced stress on the growth of cauliflower, lettuce and celery seedlings. *Ann Bot* **55**: 109-119





- Biro RL, Hunt ER, Jr., Erner Y, Jaffe MJ** (1980) Thigmomorphogenesis: changes in cell division and elongation in the internodes of mechanically-perturbed or Ethrel-treated bean plants. *Annals of Botany* **45**: 655-664
- Biro RL, Jaffe MJ** (1984) Thigmomorphogenesis: ethylene evolution and its role in the changes observed in mechanically perturbed bean plants. *Physiologia Plantarum* **62**: 289-296
- Bleecker AB, Kende H** (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**: 1-18
- Böhm S, Frishman D, Mewes HW** (1997) Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. *Nucl. Acids Res.* **25**: 2464-2469
- Botella JR, Arteca RN, Frangos JA** (1995) A mechanical strain-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 1595-1598
- Boyer N** (1967) Modification de la croissance de la tige de bryone (*Bryonia dioica*) à la suite d'irritations tactiles. *Compte Rendu de l'académie des sciences de Paris* **267**: 2114-2117
- Boyer N, Chapelle B, Gaspar T** (1979) Lithium inhibition of the thigmomorphogenetic response in *Bryonia dioica*. *Plant Physiol.* **63**: 1215-1216
- Boyer N, Desbiez M-O, Hofinger M, Gaspar T** (1983) Effect of lithium on thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica* ethylene production and sensitivity. *Plant Physiol.* **72**: 522-525
- Braam J** (1992) Regulated expression of the calmodulin-related *TCH* genes in cultured *Arabidopsis* cells: induction by calcium and heat shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 3213-3216
- Braam J** (2005) In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist* **165**: 373-389
- Braam J, Davis RW** (1990) Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell* **60**: 357-364
- Braam J, Sistrunk ML, Polisensky DH, Xu W, Purugganan MM, Antosiewicz DM, Campbell P, Johnson KA** (1997) Plant responses to environmental stress: regulation and functions of the *Arabidopsis TCH* genes. *Planta* **203**: S35-S41
- Brown KM, Leopold AC** (1973) Ethylene and the regulation of growth in pine. *Canadian Journal of Forest Research* **3**: 143-145
- Brown RS** (2005) Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Current Opinion in Structural Biology* **15**: 94-98



- Canuto KM, Souza Neto MAd, Garruti DdS, Lima MACd** (2010) Evaluation of the use of ethylene inhibitors on production of volatile compounds and mangiferin in mango fruit. *Quimica Nova* **33**: 1535-1540
- Chakrabarty R, Banerjee R, Chung S-M, Farman M, Citovsky V, Hogenhout SA, Tzfira T, Goodin M** (2007) pSITE vectors for stable integration or transient expression of



- autofluorescent protein fusions in plants: probing *Nicotiana benthamiana*-virus interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 740-750
- Chang S, Puryear J, Cairney J** (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**: 113-116
- Chehab EW, Eich E, Braam J** (2009) Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation. *J. Exp. Bot.* **60**: 43-56
- Chiambaretta F, De Graeve F, Turet G, Marceau G, Gain P, Dastugue B, Rigal D, Sapin V** (2004) Cell and tissue specific expression of human Krüppel-like transcription factors in human ocular surface. *Molecular Vision*: 901-909
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK** (2006) Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* **126**: 52-61
- Chung HS, Koo AJK, Gao X, Jayanty S, Thines B, Jones AD, Howe GA** (2008) Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-Domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology* **146**: 952-964
- Ciftci-Yilmaz S, Mittler R** (2008) The zinc finger network of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**: 1150-1160
- Ciftci-Yilmaz S, Morsy MR, Song L, Coutu A, Krizek BA, Lewis MW, Warren D, Cushman J, Connolly EL, Mittler R** (2007) The EAR-motif of the Cys2/His2-type zinc finger protein Zat7 plays a key role in the defense response of *Arabidopsis* to salinity stress. *J. Biol. Chem.* **282**: 9260-9268
- Clapham DE** (1995) Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268
- Cosgrove DJ, Hedrich R** (1991) Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* **186**: 143-153
- Coutand C, Dupraz C, Jaouen GI, Ploquin Sp, Adam B** (2008) Mechanical stimuli regulate the allocation of biomass in trees: demonstration with young *Prunus avium* trees. *Annals of Botany* **101**: 1421-1432
- Coutand C, Martin L, Leblanc-Fournier N, Decourteix M, Julien J-L, Moulia B** (2009) Strain mechanosensing quantitatively controls diameter growth and *PtaZFP2* gene expression in poplar. *Plant Physiol.* **151**: 223-232
- Coutand C, Moulia B** (2000) Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1825-1842
- Crouzet J** (2002) Caractérisation physiologique et moléculaire de l'effet d'une sollicitation mécanique chez le noyer (*Juglans regia*). DEA, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.
- Crowell EF, Bischoff V, Desprez T, Rolland A, Stierhof Y-D, Schumacher K, Gonneau M, Hofte H, Vernhettes S** (2009) Pausing of golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 1141-1154



- Davletova S, Schlauch K, Coutu J, Mittler R** (2005) The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**: 847-856



- De Jaegher G, Boyer N, Bon MC, Gaspar T** (1987) Thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*: early events in ethylene biosynthesis pathway. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen* **182**: 49-56
- Depège N, Thonat C, Coutand C, Julien J-L, Boyer N** (1997) Morphological responses and molecular modifications in tomato plants after mechanical stimulation. *Plant Cell Physiol.* **38**: 1127-1134
- Depège N, Varenne M, Boyer N** (2000) Induction of oxidative stress and GPX-like protein activation in tomato plants after mechanical stimulation. *Physiologia Plantarum* **110**: 209-214
- Desikan R, A.-H.-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ** (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* **127**: 159-172
- Ding JP, Pickard BG** (1993) Mechanosensory calcium-selective cation channels in epidermal cells. *The Plant Journal* **3**: 83-110
- Dinneny JR, Weigel D, Yanofsky MF** (2006) *NUBBIN* and *JAGGED* define stamen and carpel shape in *Arabidopsis*. *Development* **133**: 1645-1655
- Ditengou FA, Tealea WD, Kochersperger P, Flittner KA, Kneuper I, van der Graaff E, Nziengui H, Pinosa F, Li XG, Nitschke R, Laux T, Palme K** (2008) Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 18818-18823
- Doherty CJ, Van Buskirk HA, Myers SJ, Thomashow MF** (2009) Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell* **21**: 972-984
- Dominguez D, Montserrat-Sentis B, Virgos-Soler A, Guaita S, Grueso J, Porta M, Puig I, Baulida J, Franci C, Garcia de Herreros A** (2003) Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the Snail transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 5078-5089

E-F

- Edgar RC** (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids Res.* **32**: 1792-1797
- Englbrecht CC, Schoof H, Bohm S** (2004) Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genomics* **5**: 39
- Erner Y, Jaffe MJ** (1983) Thigmomorphogenesis: membrane lipid and protein changes in bean plants as affected by mechanical perturbation and Ethrel. *Physiologia Plantarum* **58**: 197-203
- Falkenstein E, Groth B, Mithöfer A, Weiler EW** (1991) Methyljasmonate and  $\alpha$ -linolenic acid are potent inducers of tendril coiling. *Planta* **185**: 316-322
- Farge E** (2003) Mechanical induction of *Twist* in the drosophila foregut/stomodaeal primordium. *Current Biology* **13**: 1365-1377
- Fisher DD, Cyr RJ** (2000) Mechanical forces in Plant Growth and Development Gravitational and Space Biology Bulletin **13**: 67-74
- Fluch S, Olmo C, Tauber S, Stierschneider M, Kopecky D, Reichenauer T, Matušíková I** (2008) Transcriptomic changes in wind-exposed poplar leaves are dependent on developmental stage. *Planta* **228**: 757-764



**Frahry G, Schopfer P** (1998) Inhibition of O<sub>2</sub>-reducing activity of horseradish peroxidase by diphenyleneiodonium. *Phytochemistry* **48**: 223-227



**Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M, Mackay JP** (2007) Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends in Biochemical Sciences* **32**: 63-70

**Gao H, Gong YW, Yuan YJ** (2007) RGD-dependent mechanotransduction of suspension cultured *Taxus* cell in response to shear stress. *Biotechnology Progress* **23**: 673-679

**Garrido I, Espinosa F, Álvarez-Tinaut M** (2009) Oxidative defence reactions in sunflower roots induced by methyl-jasmonate and methyl-salicylate and their relation with calcium signalling. *Protoplasma* **237**: 27-39

**Gartner BL** (1994) Root biomechanics and whole-plant allocation patterns: responses of tomato plants to stem flexure. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1647-1654

**Gechev TS, VanBreusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C** (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* **28**: 1091-1101

**Genové G, Glick B, Barth A** (2005) Brighter reporter genes from multimerized fluorescent proteins. *Biotechniques* **39**: 814-818

**Gillespie PG, Walker RG** (2001) Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature* **413**: 194-202

**Goeschl JD, Rappaport L, Pratt HK** (1966) Ethylene as a factor regulating the growth of pea epicotyls subjected to physical stress. *Plant Physiol.* **41**: 877-884

**Goldfarb AN, Lewandowska K** (1994) Nuclear redirection of a cytoplasmic helix-loop-helix protein *via* heterodimerization with a nuclear localizing partner. *Experimental Cell Research* **214**: 481-485

**Goodman AM, Ennos AR** (1996) A comparative study of the response of the roots and shoots of sunflower and maize to mechanical stimulation. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1499-1507

**Gourcilleau D, Lenne C, Armenise C, Moulia B, Julien J-L, Bronner G, Leblanc-Fournier N** (2011) Phylogenetic study of plant Q-type C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger proteins and expression analysis of poplar genes in response to osmotic, cold and mechanical stresses. *DNA research*

**Guindon S, Gascuel O** (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696-704



**Hamant O, Heisler MG, Jonsson H, Krupinski P, Uyttewaal M, Bokov P, Corson F, Sahlin P, Boudaoud A, Meyerowitz EM, Couder Y, Traas J** (2008) Developmental patterning by mechanical signals in *Arabidopsis*. *Science* **322**: 1650-1655

**Haswell ES, Meyerowitz EM** (2006) MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **16**: 1-11





- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse J-M** (2008) Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the *Arabidopsis* root. *Current Biology* **18**: 730-734
- Hu X, Jiang M, Zhang J, Zhang A, Lin F, Tan M** (2007) Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in leaves of maize (*Zea mays*) plants. *New Phytologist* **173**: 27-38
- Huang J, Yang X, Wang M-M, Tang H-J, Ding L-Y, Shen Y, Zhang H-S** (2007) A novel rice C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-type zinc finger protein lacking DLN-box/EAR-motif plays a role in salt tolerance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1769**: 220-227
- Hynes RO** (1999) Cell adhesion: old and new questions. *Trends in Cell Biology* **9**: M33-M37
- Hynes RO, Zhao Q** (2000) The evolution of cell adhesion. *J. Cell Biol.* **150**: 89F-96

J

- Jacobs M** (1954) The effect of wind sway on the form and development of *Pinus radiata* D. Don. . *Australian Journal of Botany* **2**: 35-51
- Jaffe MJ** (1973) Thigmomorphogenesis: the response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* **114**: 143-157
- Jaffe MJ, Biro R** (1977) Thigmomorphogenesis: the role of ethylene in wind induced growth retardation. *In* Proceedings of the Plant growth Regulator Working Group. Fourth annual meeting, Hot Springs, Arkansas, August 9-11, 1977. Plant Growth Regulator Working Group., Longmont, Colorado USA, pp 118-124
- Jaffe MJ, Forbes S** (1993) Thigmomorphogenesis - the effect of mechanical perturbation on plants. *Plant Growth Regulation* **12**: 313-324
- Jaffe MJ, Leopold AC, Staples RC** (2002) Thigmo responses in plants and fungi. *American Journal of Botany* **89**: 375-382
- Johnson KA, Sistrunk ML, Polisensky DH, Braam J** (1998) *Arabidopsis thaliana* responses to mechanical stimulation do not require *ETR1* or *EIN2*. *Plant Physiol.* **116**: 643-649
- Jones RS, Mitchell CA** (1989) Calcium ion involvement in growth inhibition of mechanically stressed soybean (*Glycine max*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **76**: 598-602

K

- Kagale S, Links MG, Rozwadowski K** (2010) Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **152**: 1109-1134
- Kam J, Gresshoff P, Shorter R, Xue G-P** (2008) The Q-type C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger subfamily of transcription factors in *Triticum aestivum* is predominantly expressed in roots and enriched with members containing an EAR repressor motif and responsive to drought stress. *Plant Molecular Biology* **67**: 305-322
- Kaplan B, Davydov O, Knight H, Galon Y, Knight MR, Fluhr R, Fromm H** (2006) Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients reveal ABRE-related sequences as Ca<sup>2+</sup>-responsive *cis* elements in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 2733-2748



- Karimi M, Inzé D, Depicker A** (2002) GATEWAY(TM) vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**: 193-195
- Katsuya S, Taiji A, Mamoru M, Yoshihiro T** (2005) Quantitative evaluation of threshold fiber strain that induces reorganization of cytoskeletal actin fiber structure in osteoblastic cells. *Journal of biomechanics* **38**: 1895-1901
- Kazan K** (2006) Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif-containing repressors. *Trends in Plant Science* **11**: 109-112
- Kim JC, Lee SH, Cheong YH, Yoo CM, Lee SI, Chun HJ, Yun DJ, Hong JC, Lee SY, Lim CO, Cho MJ** (2001) A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *The Plant Journal* **25**: 247-259
- Kim MC, Chung WS, Yun D-J, Cho MJ** (2009) Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Molecular Plant* **2**: 13-21
- Kim SH, Hong JK, Lee SC, Sohn KH, Jung HW, Hwang BK** (2004) *CAZFP1*, Cys2/His2-type zinc-finger transcription factor gene functions as a pathogen-induced early-defense gene in *Capsicum annuum*. *Plant Molecular Biology* **55**: 883-904
- Kim SN, Hu JN, Oh YY, Park J, Choi J, Lee Y, Dean RA, Mitchell TK** (2010) Combining ChIP-chip and expression profiling to model the MoCRZ1 mediated circuit for Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signaling in the rice blast fungus. *PLoS Pathogens*: e1000909
- Klug A, Schwabe JW** (1995) Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J.* **9**: 597-604
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ** (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* **352**: 524-526
- Knight MR, Smith SM, Trewavas AJ** (1992) Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 4967-4971
- Ko J-H, Han K-H, Park S, Yang J** (2004) Plant body weight-induced secondary growth in *Arabidopsis* and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. *Plant Physiol.* **135**: 1069-1083
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of *TL-DNA* gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics MGG* **204**: 383-396
- Koo AJK, Howe GA** (2009) The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* **70**: 1571-1580
- Koshiba T, Ballas N, Wong L-M, Theologis A** (1995) Transcriptional regulation of *PS-IAA4/5* and *PS-IAA6* early gene expression by indoleacetic acid and protein synthesis inhibitors in pea (*Pisum sativum*). *Journal of Molecular Biology* **253**: 396-413
- Kubo K, Sakamoto A, Kobayashi A, Rybka Z, Kanno Y, Nakagawa H, Nishino T, Takatsuji H** (1998) Cys(2)/His(2) zinc-finger protein family of petunia: evolution and general mechanism of target-sequence recognition. *Nucleic Acids Research* **26**: 608-615



**Lakhal W** (2010) Caractérisation moléculaire de la cinétique d'acclimatation des peupliers (*Populus tremula x alba*) à des flexions multiples. DEA, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.



- Larson PR** (1965) Stem form of young larch as influenced by wind and pruning. *Forest Science* **11**: 412-424
- Lavee S, Parnes A, Avidan N** (2010) Involvement of ethylene in growth induction of stationary tobacco pith tissue *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **103**: 123-129
- Leblanc-Fournier N, Coutand C, Crouzet J, Brunel N, Lenne C, Moulia B, Julien J-L** (2008) *Jr-ZFP2*, encoding a Cys2/His2-type transcription factor, is involved in the early stages of the mechano-perception pathway and specifically expressed in mechanically stimulated tissues in woody plants. *Plant, Cell & Environment* **31**: 715-726
- Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A** (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist* **171**: 249-269
- Lee D, Polisensky DH, Braam J** (2005) Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and *XTH* genes. *New Phytologist* **165**: 429-444
- Lee H, Lee J-S, Bae E-K, Choi Y-I, Noh E-W** (2005) Differential expression of a poplar copper chaperone gene in response to various abiotic stresses. *Tree Physiology* **25**: 395-401
- Lefèvre J, Boyer N, Gaspar T, Desbiez M-O** (1993) Changes of peroxidase activity related to storage of information and immediate or delayed expression on the effect of cotyledons pickings on hypocotyl growth in *Tomato*. In KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel, H Greppin, eds, *Plant Peroxidase: Biochemistry and Physiology*, University of Geneva, pp 345-348
- Legue V, Blancaflor E, Wymer C, Perbal G, Fantin D, Gilroy S** (1997) Cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> in *Arabidopsis* roots changes in response to touch but not gravity. *Plant Physiol.* **114**: 789-800
- Leplé J, Brasileiro A, Michel M, Delmotte F, Jouanin L** (1992) Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Reports* **11**: 137-141
- Lorenzo O, Chico JM, Sanchez-Serrano JJ, Solano R** (2004) *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1938-1950



- Marcum JM, Dedman JR, Brinkley BR, Means AR** (1978) Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 3771-3775
- Martin L** (2009) Etude des étapes précoces de la mécanoperception chez le peuplier : approches biomécaniques et moléculaire. Blaise Pascal, Clermont-Ferrand
- Martin L, Leblanc-Fournier N, Azri W, Lenne C, Henry C, Coutand C, Julien J-L** (2009) Characterization and expression analysis under bending and other abiotic factors of *PtaZFP2*, a poplar gene encoding a Cys2/His2 zinc finger protein. *Tree Physiol* **29**: 125-136
- Martin L, Leblanc-Fournier N, Julien JL, Moulia B, Coutand C** (2010) Acclimation kinetics of physiological and molecular responses of plants to multiple mechanical loadings. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2403-2412



- Mattanovich D, R  ker F, da C  mara Machado A, Laimer M, Regner F, Steinkelin H, Himmler G, Katinger H** (1989) Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation. *Nucleic Acids Research* **17**: 6747
- Mauch F, Kmecl A, Schaffrath U, Volrath S, Gorlach J, Ward E, Ryals J, Dudler R** (1997) Mechanosensitive expression of a lipoxygenase gene in wheat. *Plant Physiol.* **114**: 1561-1566
- Mazars C, Bourque S, Mith  fer A, Pugin A, Ranjeva R** (2009) Calcium homeostasis in plant cell nuclei. *New Phytologist* **181**: 261-274
- Mazars C, Thuleau P, Lamotte O, Bourque Sp** (2010) Cross-talk between ROS and calcium in regulation of nuclear activities. *Molecular Plant* **3**: 706-718
- McAinsh MR, Hetherington AM** (1998) Encoding specificity in Ca<sup>2+</sup> signalling systems. *Trends in Plant Science* **3**: 32-36
- McAinsh MR, Pittman JK** (2009) Shaping the calcium signature. *New Phytologist* **181**: 275-294
- McMaugh S, Lyon B** (2003) Real-time quantitative RT-PCR assay of gene expression in plant roots during fungal pathogenesis. *Biotechniques* **34**: 982-986
- Meissner R, Michael AJ** (1997) Isolation and characterisation of a diverse family of *Arabidopsis* two and three-fingered C2H2 zinc finger protein genes and cDNAs. *Plant Molecular Biology* **33**: 615-624
- Memelink J** (2009) Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* **70**: 1560-1570
- Meng SX, Lieffers VJ, Reid DEB, Rudnicki M, Silins U, Jin M** (2006) Reducing stem bending increases the height growth of tall pines. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3175-3182
- Miller G, Shulaev V, Ron M** (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* **133**: 481-489
- Miller J, McLachlan A, Klug A** (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO journal* **4**: 1609-1614
- Mingot J-M, Vega S, Maestro B, Sanz JM, Nieto MA** (2009) Characterization of Snail nuclear import pathways as representatives of C2H2 zinc finger transcription factors. *J Cell Sci* **122**: 1452-1460
- Mitchell CA** (1992) Modification of plant growth and development by acceleration and vibration: concerns and opportunities for plant experimentation in orbiting spacecraft. *Advances in Space Research* **12**: 219-225
- Mitsuda N, Ohme-Takagi M** (2009) Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **50**: 1232-1248
- Mittler R, Kim Y, Song L, Coutu J, Coutu A, Ciftci-Yilmaz S, Lee H, Stevenson B, Zhu J-K** (2006) Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Letters* **580**: 6537-6542
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki K** (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 765-769





- Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S** (2009) Ca<sup>2+</sup> regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **21**: 2341-2356
- Monshausen GB, Gilroy S** (2009) Feeling green: mechanosensing in plants. **19**: 228-235
- Mori IC, Schroeder JI** (2004) Reactive oxygen species activation of plant Ca<sup>2+</sup> channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiol.* **135**: 702-708
- Morizet J, Mingeau M** (1976) Effect of environment on water-uptake, as studied on beheaded exuding tomato. 1. role of nutrients. *Annals of Agronomy* **27**: 183-205
- Moulia B, Combes D** (2004) Les régulations mécanoperceptives de la croissance : mécanismes écophysiologiques et importance en conditions agronomiques. *In* Séminaire de l'UMR Grandes Cultures INRA Grignon.,
- Moulia B, Coutand C, Lenne C** (2006) Posture control and skeletal mechanical acclimation in terrestrial plants: implications for mechanical modeling of plant architecture. *Am. J. Bot.* **93**: 1477-1489
- Moulia B, Der Loughian C, Bastien R, Martin L, Rodríguez M, Gourcilleau D, Barbacci A, Badel E, Franchel J, Lenne C, Roeckel-Drevet P, Allain JM, Frachisse JM, de Langre E, Coutand C, Fournier-Leblanc N, Julien JL** (*on press*) Integrative mechanobiology of growth and architectural development in changing mechanical environments. *In* P Wojtaszek, ed, *Mechanical Integration of Plant Cells and Plants*. Springer
- Moulia B, Fournier-Djimbi M** (1997) Optimal mechanical design of plant stems: the models behind the allometric power laws. *In* G Jeronimidis, J Vincent, eds. *Plant Biomechanics* Reading Univ, pp 43-55
- Mundel C, Baltz R, Eliasson Å, Bronner R, Grass N, Kräuter R, Evrard J-L, Steinmetz A** (2000) A LIM-domain protein from sunflower is localized to the cytoplasm and/or nucleus in a wide variety of tissues and is associated with the phragmoplast in dividing cells. *Plant Molecular Biology* **42**: 291-302
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497

NO

- Nakagawa H, Ferrario S, Angenent GC, Kobayashi A, Takatsuji H** (2004) The petunia ortholog of *Arabidopsis* *SUPERMAN* plays a distinct role in floral organ morphogenesis. *Plant Cell* **16**: 920-932
- Nakagawa H, Jiang CJ, Sakakibara H, Kojima M, Honda I, Ajisaka H, Nishijima T, Koshioka M, Homma T, Mander LN, Takatsuji H** (2005) Overexpression of a petunia zinc-finger gene alters cytokinin metabolism and plant forms. *The Plant Journal* **41**: 512-523
- Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsumi H, Furuichi T, Kishigami A, Sokabe M, Kojima I, Sato S, Kato T, Tabata S, Iida K, Terashima A, Nakano M, Ikeda M, Yamanaka T, Iida H** (2007) *Arabidopsis* plasma membrane protein crucial for Ca<sup>2+</sup> influx and touch sensing in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 3639-3644



- Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, Shinshi H, Ohme-Takagi M** (2001) Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**: 1959-1968
- Onguso JMa, Mizutani F, Hossain ABMS** (2006) The effect of trunk electric vibration on the growth, yield and fruit quality of peach trees (*Prunus persica* [L.] Batsch). *Scientia Horticulturae* **108**: 359-363
- Orozco-Cardenas M, Ryan CA** (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin *via* the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6553-6557



- Pappas T, Mitchell CA** (1985) Effects of seismic stress on the vegetative growth of *Glycine max* (L.) Merr. cv. Wells II. *Plant, Cell & Environment* **8**: 143-148
- Pauw B, Hilliou FAO, Martin VS, Chatel G, de Wolf CJF, Champion A, Prézel M, Duijn Bv, Kijne JW, van der Fits L, Memelink J** (2004) Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus*. *The journal of biological chemistry* **279**: 52940-52948
- Pauwels L, Goossens A** (2008) Fine-tuning of early events in the jasmonate response. *plant signaling and behaviour* **3**: 846-847
- Pauwels L, Morreel K, De Witte E, Lammertyn F, Van Montagu M, Boerjan W, Inzé D, Goossens A** (2008) Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 1380-1385
- Payne T, Johnson SD, Koltunow AM** (2004) KNUCKLES (KNU) encodes a C2H2 zinc-finger protein that regulates development of basal pattern elements of the *Arabidopsis* gynoecium. *Development* **131**: 3737-3749
- Perbal G** (2009) From ROOTS to GRAVI-1: twenty five years for understanding how plants sense gravity. *Microgravity Science and Technology* **21**: 3-10
- Peyronnet R, Haswell ES, Barbier-Brygoo H, Frachisse J-M** (2008) AtMSL9 and AtMSL10: sensors of plasma membrane tension in *Arabidopsis* roots. *Plant Signal Behav* **3**: 726-729
- Pigliucci M** (2001) Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. John Hopkins University Press.
- Polisensky DH, Braam J** (1996) Cold-shock regulation of the *Arabidopsis* *TCH* genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiology* **111**: 1271-1279
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK** (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* **12**: 98-105
- Pourrut B, Perchet G, Silvestre J, Cecchi M, Guiresse M, Pinelli E** (2008) Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *Journal of Plant Physiology* **165**: 571-579
- Pruyn ML, Ewers BJ, III, Telewski FW** (2000) Thigmomorphogenesis: changes in the morphology and mechanical properties of two *Populus* hybrids in response to mechanical perturbation. *Tree Physiol* **20**: 535-540



Q-R

- Qu L-J, Zhu Y-X** (2006) Transcription factor families in *Arabidopsis*: major progress and outstanding issues for future research. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 544-549
- Reubens B, Pannemans B, Danjon F, De Proft M, De Baets S, De Baerdemaeker J, Poesen J, Muys B** (2009) The effect of mechanical stimulation on root and shoot development of young containerised *Quercus robur* and *Robinia pseudoacacia* trees. *Trees - Structure and Function* **23**: 1213-1228
- Rizhsky L, Davletova S, Liang H, Mittler R** (2004) The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 11736-11743
- Robitaille HA, Leopold AC** (1974) Ethylene and the regulation of apple stem growth under stress. *Physiologia Plantarum* **32**: 301-304
- Rodriguez M, Langre Ed, Moulia B** (2008) A scaling law for the effects of architecture and allometry on tree vibration modes suggests a biological tuning to modal compartmentalization. *Am. J. Bot.* **95**: 1523-1537
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ** (2010) WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* **15**: 247-258



- Sakai H, Medrano LJ, Meyerowitz EM** (1995) Role of *SUPERMAN* in maintaining *Arabidopsis* floral whorl boundaries. *Nature* **378**: 199-203
- Sakamoto H, Araki T, Meshi T, Iwabuchi M** (2000) Expression of a subset of the *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger protein gene family under water stress. *Gene* **248**: 23-32
- Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiol.* **136**: 2734-2746
- Salisbury F** (1963) The flowering process. Macmillan, New York
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF** (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**: 691-706
- Saotome Y, Winter CG, Hirsh D** (1995) A widely expressed novel C2H2 zinc-finger protein with multiple consensus phosphorylation sites is conserved in mouse and man. *Gene* **152**: 233-238
- Sargent CY, Berguig GY, Kinney MA, Hiatt LA, Carpenedo RL, Berson RE, McDevitt TC** (2010) Hydrodynamic modulation of embryonic stem cell differentiation by rotary orbital suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering* **105**: 611-626
- Schilmiller AL, Howe GA** (2005) Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 369-377
- Schopfer P** (2006) Biomechanics of plant growth. *Am. J. Bot.* **93**: 1415-1425
- Seibel NM, Eljouni J, Nalaskowski MM, Hampe W** (2007) Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Analytical Biochemistry* **368**: 95-99



- Sistrunk ML, Antosiewicz DM, Purugganan MM, Braam J** (1994) *Arabidopsis TCH3* encodes a novel Ca<sup>2+</sup> binding protein and shows environmentally induced and tissue-specific regulation. *Plant Cell* **6**: 1553-1565
- Slesak I, Slesak H, Libik M, Misalski Z** (2008) Antioxidant response system in the short-term post-wounding effect in *Mesembryanthemum crystallinum* leaves. *Journal of Plant Physiology* **165**: 127-137
- Smith VC, Ennos AR** (2003) The effects of air flow and stem flexure on the mechanical and hydraulic properties of the stems of sunflowers *Helianthus annuus* L. *J. Exp. Bot.* **54**: 845-849
- Snedden WA, Fromm H** (1998) Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Science* **3**: 299-304
- Steffens B, Sauter M** (2009) Epidermal cell death in rice is confined to cells with a distinct molecular identity and is mediated by ethylene and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through an autoamplified signal pathway. *Plant Cell* **21**: 184-196
- Stokes A, Fitter AH, Courts MP** (1995) Responses of young trees to wind and shading: effects on root architecture. *Journal of Experimental Botany* **46**: 1139-1146
- Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, Catala R, Salinas J, Matsui K, Ohme-Takagi M, Takatsuji H** (2003) Stress-responsive zinc finger gene *ZPT2-3* plays a role in drought tolerance in petunia. *Plant Journal* **36**: 830-841
- Sukharev SI, Blount P, Martinac B, Kung aC** (1997) Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. *Annual Review of Physiology* **59**: 633-657
- Supatto W, Débarre D, Moulia B, Brouzés E, Martin J-L, Farge E, Beaurepaire E** (2005) *In vivo* modulation of morphogenetic movements in *Drosophila* embryos with femtosecond laser pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 1047-1052



- Taiz L, Zeiger E** (2006) *Plant Physiology*, Ed 4th edition. Sinauer Associates Inc., U. S
- Takatsuji H** (1999) Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science. *Plant Molecular Biology* **39**: 1073-1078
- Takatsuji H, Matsumoto T** (1996) Target-sequence recognition by separate-type Cys<sup>2</sup>/His<sup>2</sup> zinc finger proteins in plants. *J. Biol. Chem.* **271**: 23368-23373
- Takatsuji H, Mori M, Benfey PN, Ren L, Chua NH** (1992) Characterization of a zinc finger DNA-binding protein expressed specifically in *Petunia* petals and seedlings. *EMBO Journal* **11**: 241-249
- Takeda S, Matsumoto N, Okada K** (2004) *RABBIT EARS*, encoding a *SUPERMAN*-like zinc finger protein, regulates petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**: 425-434
- Tatsuki M, Mori H** (1999) Rapid and transient expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isogenes by touch and wound stimuli in tomato. *Plant and Cell Physiology* **40**: 709-715
- Telewski FW** (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany* **93**: 1466-1476





- Telewski FW, Jaffe MJ** (1986) Thigmomorphogenesis: field and laboratory studies of *Abies fraseri* in response to wind or mechanical perturbation. *Physiologia Plantarum* **66**: 211-218
- Telewski FW, Pruyn ML** (1998) Thigmomorphogenesis: a dose response to flexing in *Ulmus americana* seedlings. *Tree Physiology* **18**: 65-68
- Tretner C, Huth U, Hause B** (2008) Mechanostimulation of *Medicago truncatula* leads to enhanced levels of jasmonic acid. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2847-2856
- Tschaplinski T, Tuskan G, Gunderson C** (1994) Water-stress tolerance of black and eastern cottonwood clone and four hybrid progeny. I. Growth, water relations and gas exchange. *Canadian Journal of Forest Research* **24**: 364-371
- Tupler R, Perini G, Green MR** (2001) Expressing the human genome. *Nature* **409**: 832-833
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U et al.** (2006) The Genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**: 1596-1604

U-V

- Uchida A, Yamamoto KT** (2002) Effects of mechanical vibration on seed germination of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant and Cell Physiology* **43**: 647-651
- van der Luit AH, Olivari C, Haley A, Knight MR, Trewavas AJ** (1999) Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* **121**: 705-714
- Veronesi C, Pouenat ML, Rickauer M, Esquerre-Tugaye MT** (1999) Regulation of tobacco lipoxygenase by methyl jasmonate and fatty acids. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie* **322**: 491-497
- Vogel JT, Zarka DG, Van Buskirk HA, Fowler SG, Thomashow MF** (2005) Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **41**: 195-211
- Vogel V** (2006) Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **35**: 459-488

W-X

- Walley JW, Coughlan S, Hudson ME, Covington MF, Kaspi R, Banu G, Harmer SL, Dehesh K** (2007) Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses *via* a novel *cis*-element. *PLoS Genet* **3**: e172
- Walter A, Mazars C, Maitrejean M, Hopke J, Ranjeva R, Boland W, Mithöfer A** (2007) Structural requirements of jasmonates and synthetic analogues as inducers of Ca<sup>2+</sup> signals in the nucleus and the cytosol of plant cells. *Angewandte Chemie International Edition* **46**: 4783-4785
- Wang KLC, Li H, Ecker JR** (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* **14**: S131-151
- Wang Y, Michel FJ, Wing A, Simmen FA, Simmen RC** (1997) Cell-type expression, immunolocalization, and deoxyribonucleic acid-binding activity of basic transcription



- element binding transcription factor, an Sp-related family member, in porcine endometrium of pregnancy. *Biology of Reproduction* **57**: 707-714
- White PJ, Broadley MR** (2003) Calcium in plants. *Ann Bot* **92**: 487-511
- Whitehead FH** (1962) Experimental studies of the effect of wind on plant growth and anatomy. *New Phytologist* **61**: 59-62
- Wolfe S, Nekludova L, Pabo C** (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **29**: 183-212
- Wright AJ, Knight H, Knight MR** (2002) Mechanically stimulated *TCH3* gene expression in *Arabidopsis* involves protein phosphorylation and EIN6 downstream of calcium. *Plant Physiol.* **128**: 1402-1409
- Wu C, You C, Li C, Long T, Chen G, Byrne ME, Zhang Q** (2008) *RID1*, encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor, acts as a master switch from vegetative to floral development in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 12915-12920
- Xu S, Wang X, Chen J** (2007) Zinc finger protein 1 (ThZF1) from salt cress (*Thellungiella halophila*) is a Cys-2/His-2-type transcription factor involved in drought and salt stress. *Plant Cell Reports* **26**: 497-506
- Xu W, Purugganan MM, Polisensky DH, Antosiewicz DM, Fry SC, Braam J** (1995) *Arabidopsis TCH4*, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell* **7**: 1555-1567



- Yahraus T, Chandra S, Legendre L, Low PS** (1995) Evidence for a mechanically induced oxidative burst. *Plant Physiol.* **109**: 1259-1266
- Yamanaka T, Nakagawa Y, Mori K, Nakano M, Imamura T, Kataoka H, Terashima A, Iida K, Kojima I, Katagiri T, Shinozaki K, Iida H** (2010) MCA1 and MCA2 that mediate Ca<sup>2+</sup> uptake have distinct and overlapping roles in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **152**: 1284-1296
- Yang T, Poovaiah BW** (2002) A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J. Biol. Chem.* **277**: 45049-45058
- Yang Y, Li R, Qi M** (2000) *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *The Plant Journal* **22**: 543-551
- Yang Z, Rayala S, Nguyen D, Vadlamudi RK, Chen S, Kumar R** (2005) Pak1 phosphorylation of Snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates Snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res* **65**: 3179-3184
- Yoo JH, Park CY, Kim JC, Do Heo W, Cheong MS, Park HC, Kim MC, Moon BC, Choi MS, Kang YH, Lee JH, Kim HS, Lee SM, Yoon HW, Lim CO, Yun D-J, Lee SY, Chung WS, Cho MJ** (2005) Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 3697-3706
- Yoshioka K, Fukushima S, Yamazaki T, Yoshida M, Takatsuji H** (2001) The plant zinc finger protein ZPT2-2 has a unique mode of DNA interaction. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 35802-35807





- Zachgo S, Silva Ed, Motte P, Trobner W, Saedler H, Schwarz-Sommer Z** (1995) Functional analysis of the *Antirrhinum* floral homeotic *DEFICIENS* gene *in vivo* and *in vitro* by using a temperature-sensitive mutant. *Development* **121**: 2861-2875
- Zhang F, White RL, Neufeld KL** (2000) Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 12577-12582
- Zhang L, Lu Y-T** (2003) Calmodulin-binding protein kinases in plants. *Trends in Plant Science* **8**: 123-127
- Zhang W, Wen C-K** (2010) Preparation of ethylene gas and comparison of ethylene responses induced by ethylene, ACC, and ethephon. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 45-53
- Zhou J, Wang B, Li Y, Wang Y, Zhu L** (2007) Responses of chrysanthemum cells to mechanical stimulation require intact microtubules and plasma membrane–cell wall adhesion. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**: 55-68
- Zhou J, Wang B, Zhu L, Li Y, Wang Y** (2006) A system for studying the effect of mechanical stress on the elongation behavior of immobilized plant cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **49**: 165-174
- Zielinski RE** (1998) Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 697-725
- Zsuffa L, Giordano E, Pryor L, Steller R** (1996) Trends in poplar culture: some global and regional perspectives. . *In* R Steller, H Bradshaw, P Heilman, T Hinckley, eds, *Biology of Populus and its implication for management and conservation* Ottawa, Canada, pp 515-539



*Annexes*





## Annexe 1

### Préparation des solutions mères du milieu MB5

Macro-éléments MB5 (10X)	1000 ml
- KCl	1,5 g
- KNO <sub>3</sub>	25 g
- MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2,5 g
- CaCl <sub>2</sub>	1,5 g
- NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	3 g
- (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5 g

→ solution à autoclaver 20 min à 120°C et conserver à 4°C

Vitamines MB5 (100X)	100 ml
- Acide nicotinique	10 mg
- Pyridoxine hydrochloride	10 mg
- Thiamine hydrochloride	10 mg

→ solution à stériliser par filtration et conserver à -20°C (aliquots de 10 ml)

Oligo-éléments M&S (1000X)	100 ml
- H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620 mg
- MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1690 mg
- ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1060 mg
- KCl	83 mg
- Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	25 mg
- CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	2,5 mg
- CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	2,5 mg
<u>ou</u> CoCl <sub>2</sub>	1,36 mg

→ solution à autoclaver 20 min à 120°C et conserver à 4°C

Fer (FeNaEDTA):	2 g dans 500 ml	} → solutions à autoclaver 20 min à 120°C et conserver à 4°C
Myo-inositol (100X) :	5 g dans 500 ml	
M.E.S (100X) :	5 g dans 200 ml	
(2-[N-Morphinol]ethansulfonic acid)		
L-glutamine (100X)	: 10 g dans 500 ml	

→ solution à stériliser par filtration et conserver à -20°C (aliquots de 10 ml)

2.4D (1 mg/ml) : 50 mg dans 50 ml d'éthanol (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)

→ solution à conserver à 4°C



### Préparation du milieu MB5

<b>pour <u>la culture cellulaire</u></b>		<b>pour <u>la callogenèse</u></b>	
Macro-éléments MB5	100 ml	Macro-éléments MB5	40 ml
Oligo-éléments M&S	1 ml	Oligo-éléments M&S	400 µl
Fer	10 ml	Fer	4 ml
Myo-inositol	10 ml	Myo-inositol	4 ml
MES	10 ml	MES	4 ml
Saccharose	30 g	Saccharose	12 g
Ajuster le pH à 5,8			
Eau distillée qsp	<b>1 L</b>	Eau distillée qsp	<b>400 ml</b>
		Agar	2.4 g
Autoclaver 20 min à 120°C			
Maintenir la température à 60°C avant d'ajouter de manière stérile			
Vitamines MB5	10 ml	Vitamines MB5	4 ml
Glutamine	10 ml	Glutamine	4 ml
2,4 D	2 ml	2,4 D	800 µl
Conserver le milieu à 4°C			

**Toutes les manipulations ont lieu sous la hotte à flux laminaire (horizontal).**

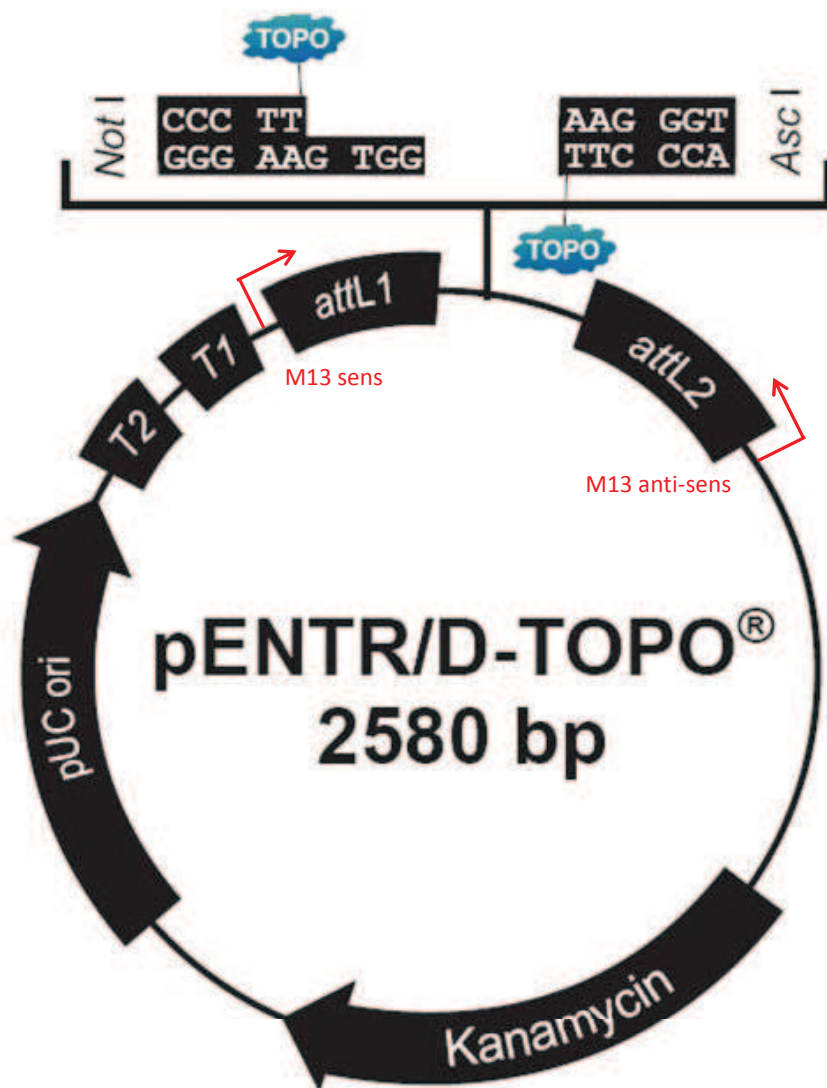
➤ pour la callogenèse : le milieu MB5 gélosé est coulé dans des boîtes de Pétri hautes (25-30 ml par boîte). Après polymérisation, les boîtes sont fermées individuellement par un parafilm et remises dans leur sac d'origine. Elles sont conservées à 4°C.

➤ pour la culture cellulaire : elle a lieu dans des erlens de 250 ml (col large) fermés par des bouchons mousse recouverts de papier alu, qui ont été au préalable autoclavés 20 min à 120°C. Les 40 ml de milieu MB5 sont ajoutés au moment du repiquage, ainsi que les vitamines MB5, la glutamine et le 2,4D.

*NB : pour une question de pratique, le milieu MB5 est réparti (40 ml) directement dans des tubes Falcon de 50 ml qui sont alors autoclavés.*



## Annexe 2

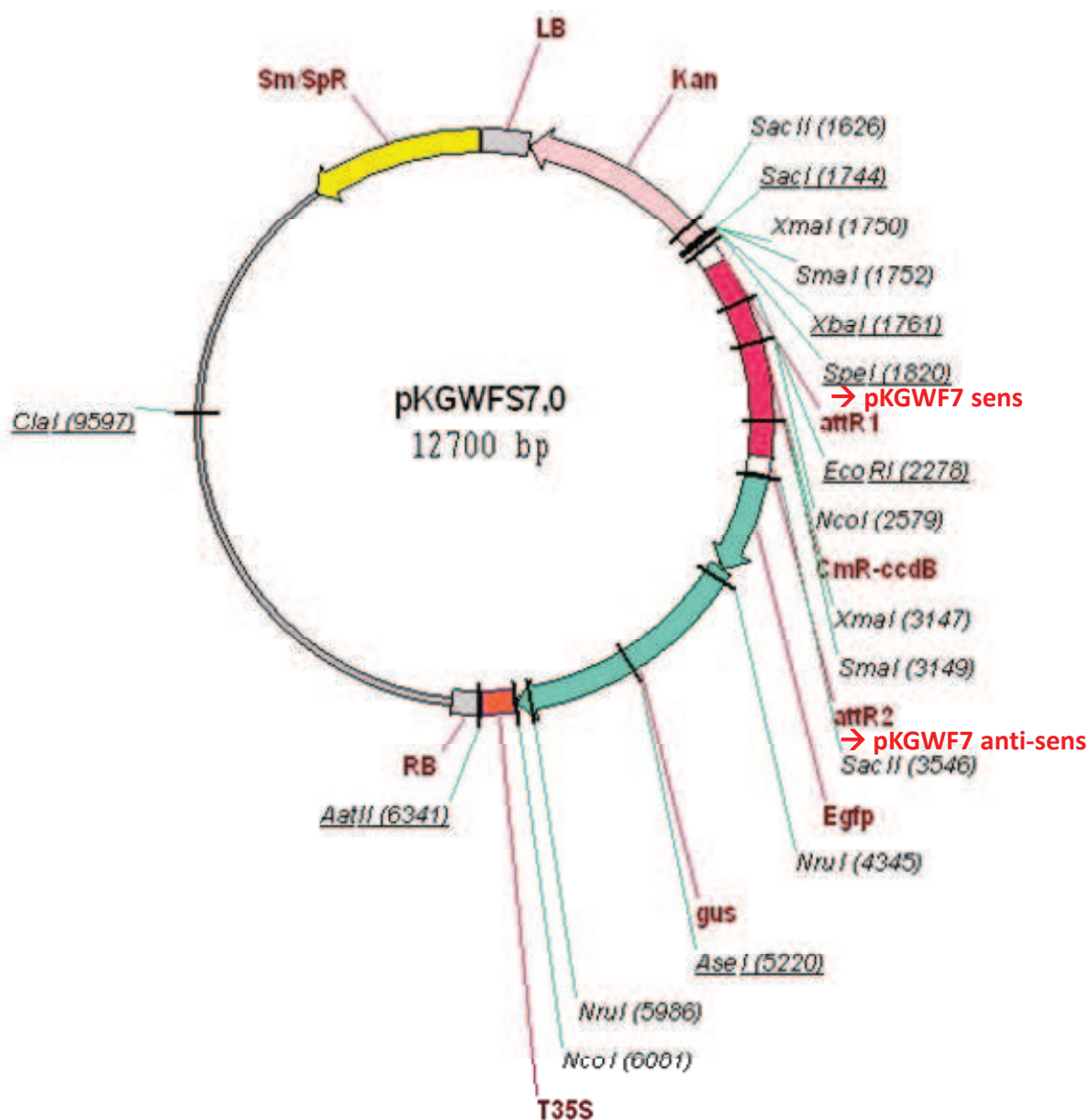


165

**Carte de restriction du vecteur d'entrée pENTR/D (Invitrogen)** utilisé pour réaliser les constructions des délétions successives du promoteur de *PtaZFP2*. AttL1 et AttL2 sont les sites de recombinaison du système Gateway. Les sites de fixation des amorces M13 (M13 sens et anti-sens) et de la TOPO-isomerase sont indiqués. Les amorces ayant servi à amplifier les fragments d'ADN du promoteur entier ou délété possède un adaptateur CACC permettant « l'accroche » au niveau du site de restriction NotI GTGG.



### Annexe 3



**Carte de restriction du vecteur de destination pKGWFS7.0 (Karimi *et al.*, 2002)** utilisé pour réaliser les constructions des délétions successives du promoteur de *PtaZFP2*. Le promoteur entier ou délété vient s'insérer entre les sites de recombinaison du système Gateway attR1 et attR2. Les sites correspondants au début des amorces pKGWFS7 sens et anti-sens sont indiqués.





## Annexe 4

### **Extraction d'ARNs totaux (grands volumes)**

- Broyer dans l'azote liquide le matériel végétal.
- Transvaser 2 à 3 g de poudre dans les grands tubes de polypropène de 30 mL.
- Ajouter 15 mL de tampon d'extraction préalablement chauffé à 65°C et mélanger.
- Placer 10 min à 65°C.
- Ajouter 1 volume (15 mL) de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) et mélanger.
- Centrifuger 15 min à 11 000 g et à température ambiante dans le rotor SS34.
- Prélever la phase aqueuse et la transférer dans un nouveau tube.
- Ajouter 1 volume (15 mL) de chloroforme/alcool isoamylique (24/1) et mélanger.
- Centrifuger 15 min à 11 000 g et à température ambiante dans le rotor SS34.
- Prélever la phase aqueuse et la transférer dans un tube Corex 15 mL.
- Ajouter ¼ de volume de LiCl 10M.
- Bien mélanger et laisser précipiter la nuit à 4°C.
- Centrifuger 30 min à 11 000 g et à 4°C.
- Eliminer le surnageant et laver le culot dans 1 mL d'éthanol 70 %.
- Centrifuger 5 min à 13 000 rpm.
- Eliminer le surnageant et laisser sécher le culot 10 min sur la paillasse.
- Reprendre délicatement le culot dans 500 µL d'eau DEPC, laisser dissoudre correctement et transférer dans un microtube de 1,5 mL.
- Doser les ARNs au nanodrop.

#### **Tampon d'extraction :**

2% (poids/volume) CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide)

2% PVP (polyvinylpyrrolidone K30)

100 mM Tris-HCl pH8

25 mM EDTA pH8

2M NaCl

Tout mélanger dans l'ordre (bien attendre que les poudres soient solubilisées avant d'ajouter le reste) et autoclaver.

Ajouter le β-mercaptoéthanol extemporanément.



## Annexe 5

### Extraction d'ADN

- Broyer les échantillons dans de l'azote liquide.
- Mettre la poudre dans un tube 2mL jusqu'au tiers du tube.
- Ajouter 950  $\mu$ L de Tampon d'extraction additionnée de 2% de  $\beta$ -mercaptoéthanol.
- Bien agiter et incubé 15 min à 65°C en agitant de temps en temps.
- Ajouter un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v).
- Bien mélanger et centrifuger 20 min à 13500 rpm et à 4°C.
- Prélever le surnageant et ajouter à nouveau un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v).
- Centrifuger 10 min à 13500 rpm et à 4°C.
- Prélever le surnageant et précipiter les ADN avec 1,5 volume d'isopropanol.
- Incuber la nuit à -20°C.
- Centrifuger 20 min à 13500 rpm et à 4°C.
- Laver le culot avec 500  $\mu$ L d'éthanol 70%.
- Centrifuger 10 min à 13500 rpm et à 4°C.
- Renouveler le lavage.
- Laisser sécher le culot 10 min sur la paillasse.
- Reprendre le culot dans 40 à 50  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O.
- Ajouter 1  $\mu$ L de RNase A (10 mg.mL<sup>-1</sup>) et incubé 30 à 60 min à 37°C.
- Doser les ADN au nanodrop et préparer des aliquots à 50 ng/ $\mu$ L.

#### Tampon d'extraction :

2% (poids/volume) CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide)

2% PVP (polyvinylpyrrolidone K30)

100 mM Tris-HCl pH8

25 mM EDTA pH8

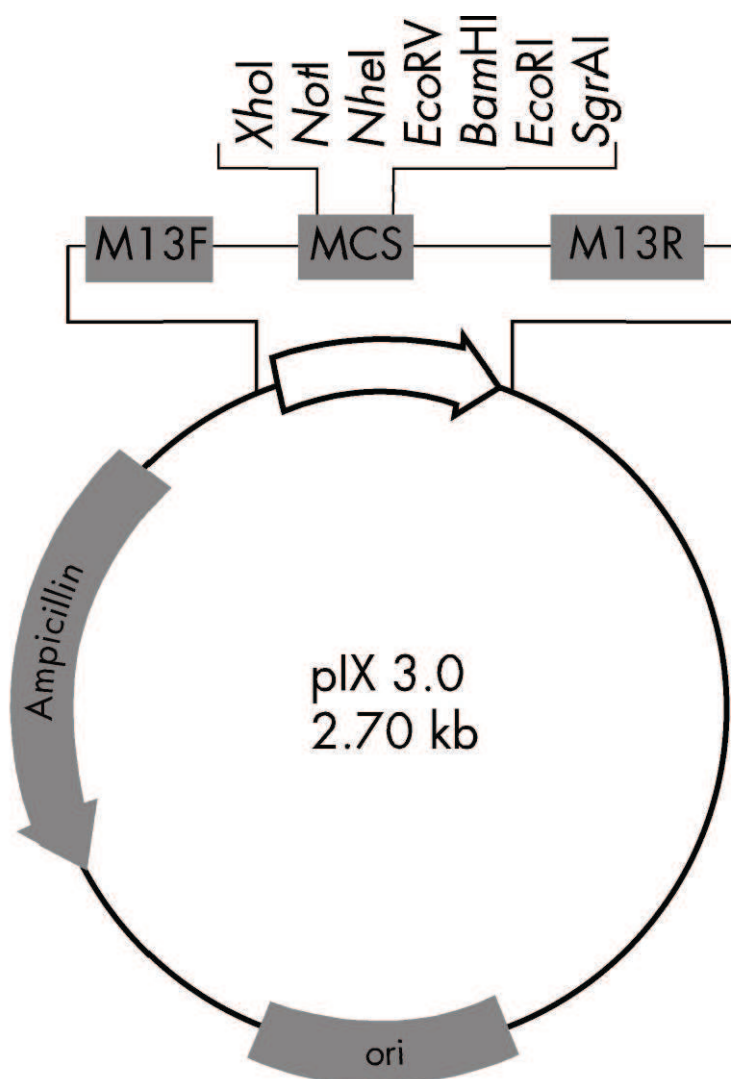
2M NaCl

Tout mélanger dans l'ordre (bien attendre que les poudres soient solubilisées avant d'ajouter le reste) et autoclaver.

Ajouter le  $\beta$ -mercaptoéthanol extemporanément.



## *Annexe 6*



**Représentation schématique du vecteur pIX3.0 (Qiagen).** Les sites de restriction des différentes enzymes ainsi que les sites correspondants aux amorces M13 (M13F et M13R) sont indiqués.



Chrm\_6\_M13F-20 .....tgaacttctgcg-a-cggcgctagct-ATACGACTC-D....GGGAGACCACAAACGGTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA  
 Chrm\_6\_M13-26REV Tggccagtgcccaagttttgtctgtttggggcgaataggtaattcgcactcaac----gggggggacattgggttt-CCCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA  
 Chrm\_pIX3.0 GGGCAGTGCCAAGCTTTCTCG-AGCGGCGCTAGCTAATAGGACTCATTATAGGGAGACCACAAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA  
  
 Chrm\_6\_M13F-20 AGAAGGAGATAAAACAATGAAGAGAGATAGAGAACAGGTTAGAGTTAGACTTGGCCAAATGCTTGAAGTTGGCGAAGCTGATCAGAG  
 Chrm\_6\_M13-26REV AGAAGGAGATAAAACAATGAAGAGAGATAGAGAACAGGTTAGAGTTAGACTTGGCCAAATGCTTGAAGTTGGCGAAGCTGATCAGAG  
 Chrm\_pIX3.0 AGAAGGAGATAAAACAATGAAGAGAGATAGAGAACAGGTTAGAGTTAGACTTGGCCAAATGCTTGAAGTTGGCGAAGCTGATCAGAG  
  
 Chrm\_6\_M13F-20 ATACTAAGTATATAGACCAGCAGCAGCAGCAGCAACGGCAGGGGCGGGCGCCGGGGCGGGTCCGCTCATTTCATGCAAAACATGCGACAAGAAATTC  
 Chrm\_6\_M13-26REV ATACTAAGTATATAGACCAGCAGCAGCAGCAGCAACGGCAGGGGCGGGCGCCGGGGCGGGTCCGCTCATTTCATGCAAAACATGCGACAAGAAATTC  
 Chrm\_pIX3.0 ATACTAAGTATATAGACCAGCAGCAGCAGCAGCAACGGCAGGGGCGGGCGGGTCCGCTCATTTCATGCAAAACATGCGACAAGAAATTC  
  
 Chrm\_6\_M13F-20 CCTTCATTTCAGAGCATTAGGAGGCGACCGTGCGAGTACCAAGAAACCAAACTCATGGAATCAACTGGGAAGCTGTGGAAGCTGCTTAATTCGCTTCA  
 Chrm\_6\_M13-26REV CCTTCATTTCAGAGCATTAGGAGGCGACCGTGCGAGTACCAAGAAACCAAACTCATGGAATCAACTGGGAAGCTGTGGAAGCTGCTTAATTCGCTTCA  
 Chrm\_pIX3.0 CCTTCATTTCAGAGCATTAGGAGGCGACCGTGCGAGTACCAAGAAACCAAACTCATGGAATCAACTGGGAAGCTGTGGAAGCTGCTTAATTCGCTTCA  
  
 Chrm\_6\_M13F-20 AAGCCAAAAACTCAGCAAGTCTCCATTTCGCGGCTTGAGTTTCCCTCTCGGGCAAGCACTCGGAAGTCACATGAAGAGACAGAGGCGCTAATAATGT  
 Chrm\_6\_M13-26REV AAGCCAAAAACTCAGCAAGTCTCCATTTCGCGGCTTGAGTTTCCCTCTCGGGCAAGCACTCGGAAGTCACATGAAGAGACAGAGGCGCTAATAATGT  
 Chrm\_pIX3.0 AAGCCAAAAACTCAGCAAGTCTCCATTTCGCGGCTTGAGTTTCCCTCTCGGGCAAGCACTCGGAAGTCACATGAAGAGACAGAGGCGCTAATAATGT  
  
 Chrm\_6\_M13F-20 GATACCACCAAGTAATAGTAGTAAGATCATGAATTGGCCGCGCGTGACTCAACCGCCTTTCTTACCAGAGCTGTCCCAAGTTTGAAGAGATCCAATAGC  
 Chrm\_6\_M13-26REV GATACCACCAAGTAATAGTAGTAAGATCATGAATTGGCCGCGCGTGACTCAACCGCCTTTCTTACCAGAGCTGTCCCAAGTTTGAAGAGATCCAATAGC  
 Chrm\_pIX3.0 GATACCACCAAGTAATAGTAGTAAGATCATGAATTGGCCGCGCGTGACTCAACCGCCTTTCTTACCAGAGCTGTCCCAAGTTTGAAGAGATCCAATAGC  
  
 Chrm\_6\_M13F-20 AGCAAGAGAGTTCTGTGCTTGGATTGAGCTTGGCCCTGCCATGTATCAGAAATGACTCGGAGTTGCAGCTAGAGAAAGGTCCTGCTCCCATGTTGAGA  
 Chrm\_6\_M13-26REV AGCAAGAGAGTTCTGTGCTTGGATTGAGCTTGGCCCTGCCATGTATCAGAAATGACTCGGAGTTGCAGCTAGAGAAAGGTCCTGCTCCCATGTTGAGA  
 Chrm\_pIX3.0 AGCAAGAGAGTTCTGTGCTTGGATTGAGCTTGGCCCTGCCATGTATCAGAAATGACTCGGAGTTGCAGCTAGAGAAAGGTCCTGCTCCCATGTTGAGA  
  
 Chrm\_6\_M13F-20 TGTTTTATCTGGGGTCACCAACCATCAGC-ATCATTAATAACTAATACTTAACCA-..GTCTGTACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGCTTGAAGGGTT  
 Chrm\_6\_M13-26REV TGTTTTATCTGGGGTCACCAACCATCAGC-ATCATTAATAACTAATACTTAACCA-..GTCTGTACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGCTTGAAGGGTT  
 Chrm\_pIX3.0 TGTTTTATCTGGGGTCACCAACCATCAGC-ATCATTAATAACTAATACTTAACCA-..GTCTGTACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGCTTGAAGGGTT  
  
 Chrm\_6\_M13F-20 TTTTGGATCCGAATTCACGATGC-..gttcg  
 Chrm\_6\_M13-26REV TTTTGGATCCGAATTCACGATGC-..gttcg  
 Chrm\_pIX3.0 TTTTGGATCCGAATTCACGATGC-..gttcg

*Nterm\_16\_M13F-20* .....ggag.....ttctcga-eggccgCTAGCT-ATACGACTC-CTATAGGGAGACCACAAACGGTTTC  
*Nterm\_16\_M13-26REV* ttttcacaggtcacta gttgtaaaaaaggagacagaatcagactttct-aggcgcccgctagataatg-gactcattataggagagaccacacacggtttc  
*Nterm\_pIX3.0* TTTTCGCAgtcACgACgtTtGTAAAAAGACGCGCAgtTGCcAAgCTTTCTCGAGCGCCGCTAGCTATATAGAGCTCAGTATAGGAGAGACCACAAACGGTTTC

*Nterm\_16\_M13F-20* CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAAGAGGAGATAAAACAATGAACACATCATCACCATCACCACCTGGAACCCACGCGCATGTCTGTAAAAAGCACCCG  
*Nterm\_16\_M13-26REV* Cctctagagataaattttgttgaactttaag-AGGAGATAAAACAATGAACACATCATCACCATCACCACCTCGAGCCACGCGCATGTCTGTAAAAAGCACCCG  
*Nterm\_pIX3.0* CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAAGAGGAGATAAAACAATGAACACATCATCACCATCACCACCTCGAGCCACGCGCATGTCTGTAAAAAGCACCCG

*Nterm\_16\_M13F-20* AATGAAGAGAGATAGAGAACAGGTAGAGTTAGACTTGGCCAAATGCTTGATGCTACTTTCTAAAGTTGGCGAAGCTGATCAGCAGATACTAACTAGTTTA  
*Nterm\_16\_M13-26REV* AATGAAGAGAGATAGAGAACAGGTAGAGTTAGACTTGGCCAAATGCTTGATGCTACTTTCTAAAGTTGGCGAAGCTGATCAGCAGATACTAACTAGTTTA  
*Nterm\_pIX3.0* AATGAAGAGAGATAGAGAACAGGTAGAGTTAGACTTGGCCAAATGCTTGATGCTACTTTCTAAAGTTGGCGAAGCTGATCAGCAGATACTAACTAGTTTA

*Nterm\_16\_M13F-20* TAGACCAGCAGCAGCAGCAGCAACGGCAGGGGCGGGCGCCGGGGCGGGTCGCTCATTTTCATGCAAAACATGCGACAAGAATTTCCCTTCATTTCAAGC  
*Nterm\_16\_M13-26REV* TAGACCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGCGAGGGGCGGGCGCCGGGGCGGGTCGCTCATTTTCATGCAAAACATGCGACAAGAATTTCCCTTCATTTCAAGC  
*Nterm\_pIX3.0* TAGACCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGCGAGGGGCGGGCGCCGGGGCGGGTCGCTCATTTTCATGCAAAACATGCGACAAGAATTTCCCTTCATTTCAAGC

*Nterm\_16\_M13F-20* ATTAGGAGGCCACCGTGCAGTCAACAAGAAACCAAAACTCATGGAATCAACTGGGAAGTTGTTGAAGCTGCTTAATTCAGGACCAAAAACCTC  
*Nterm\_16\_M13-26REV* ATTAGGAGGCCACCGTGCAGTCAACAAGAAACCAAAACTCATGGAATCAACTGGGAAGTTGTTGAAGCTGCTTAATTCAGGACCAAAAACCTC  
*Nterm\_pIX3.0* ATTAGGAGGCCACCGTGCAGTCAACAAGAAACCAAAACTCATGGAATCAACTGGGAAGTTGTTGAAGCTGCTTAATTCAGGACCAAAAACCTC

*Nterm\_16\_M13F-20* CCAGTGCTCCATTGTGGGCTTGAAGTTTCTCTCGGGCAAGCACTCGGAAGTTCACATGAGGAGACACAGGGCGCCTAATAATGTTGATACCCACAGTAA  
*Nterm\_16\_M13-26REV* CCAGTGCTCCATTGTGGGCTTGAAGTTTCTCTCGGGCAAGCACTCGGAAGTTCACATGAGGAGACACAGGGCGCCTAATAATGTTGATACCCACAGTAA  
*Nterm\_pIX3.0* CCAGTGCTCCATTGTGGGCTTGAAGTTTCTCTCGGGCAAGCACTCGGAAGTTCACATGAGGAGACACAGGGCGCCTAATAATGTTGATACCCACAGTAA

*Nterm\_16\_M13F-20* TAGTAGTAAAGATCATGAATTGGCCGCGGTGACTCAACCCTTTTCTTACCGGAAAGCTGTCCCAAGTTTGAAGAGATCCAATAGCAGCAAGAGAGTTCT  
*Nterm\_16\_M13-26REV* TAGTAGTAAAGATCATGAATTGGCCGCGGTGACTCAACCCTTTTCTTACCGGAAAGCTGTCCCAAGTTTGAAGAGATCCAATAGCAGCAAGAGAGTTCT  
*Nterm\_pIX3.0* TAGTAGTAAAGATCATGAATTGGCCGCGGTGACTCAACCCTTTTCTTACCGGAAAGCTGTCCCAAGTTTGAAGAGATCCAATAGCAGCAAGAGAGTTCT

*Nterm\_16\_M13F-20* GTGCTTGGATTGAGCTTGGCCCTGCCCATGATCAGAATGACTCGGAGTTGCAGCTAGAGAAGGTCGCTGCTCCCATGTTGAGATGTTTTTACTAATA  
*Nterm\_16\_M13-26REV* GTGCTTGGATTGAGCTTGGCCCTGCCCATGATCAGAATGACTCGGAGTTGCAGCTAGAGAAGGTCGCTGCTCCCATGTTGAGATGTTTTTACTAATA  
*Nterm\_pIX3.0* GTGCTTGGATTGAGCTTGGCCCTGCCCATGATCAGAATGACTCGGAGTTGCAGCTAGAGAAGGTCGCTGCTCCCATGTTGAGATGTTTTTACTAATA

*Nterm\_16\_M13F-20* ACTAACTAACCAAGATCTGTACCCCTT-...CCTCTAAACGGGCTTGAGGGGTTTTTGGATCCGAATTCACCGGTCGAATTTCGTAATCATGT-ataag  
*Nterm\_16\_M13-26REV* ACTAACTAACCAAGATCTGTACCCCTT-...CCTCTAAACGGGCTTGAGGGGTTTTTGGTCCGAATTCACCGgtt-...ata-  
*Nterm\_pIX3.0* ACTAACTAACCAAGATCTGTACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGCTTGAGGGGTTTTTGGATCCGAATTCACCGGTCGAATTTCGTAATCATGTCTAATA

**Alignement des séquences obtenues par les séquençages des vecteurs des bactéries transformées Cter (a) ou Nter (b) avec la séquence prédite du vecteur.** Les séquençages ont été réalisés en sens (M13F-20) et en antisens (M13-26REV) pour les deux constructions à l'aide des amorces M13 présentes sur le vecteurs pIX3.0 de part et d'autre de l'insert.







